

UNIVERSIDAD DE CUENCA



FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**“Diversidad de las comunidades de bacterias y hongos en
suelos de cultivos de frutales andinos bajo manejo orgánico y
convencional”**

*Tesis previa a la obtención del
título de Ingeniero Agrónomo*

AUTOR:

Carlos Antonio Riera Alvarez

DIRECTOR:

Blgo. Luis Andrés Yarzábal Rodríguez Ph. D

CUENCA – ECUADOR

2017

RESUMEN

El suelo es uno de los ecosistemas más complejos y heterogéneos debido a su variada composición y a su abundante diversidad de microorganismos. La caracterización de las comunidades microbianas que colonizan dicho ecosistema se ha visto limitada debido a que las metodologías clásicas solo permiten el estudio de un mínimo porcentaje de la microvida del suelo, los denominados microorganismos *cultivables*. En el presente estudio se utilizó la técnica molecular DGGE (Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante) para identificar las diferencias y similitudes en las características de las comunidades microbianas presentes en 5 pares de suelos cultivados con frutales andinos bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional, utilizando como cebadores las regiones ITS y ADNr 16S.

En los resultados obtenidos no se observaron diferencias significativas en los perfiles del DGGE en cada par de muestras, lo cual significa que las comunidades fúngicas y bacterianas son muy similares en los suelos con los dos sistemas de manejo, excepto en el Índice de equitatividad correspondiente a los perfiles de la región ITS, el cual aparentemente es mayor en suelos orgánicos. Sin embargo, los resultados obtenidos a través de ésta investigación permitirán ampliar nuestro conocimiento sobre las consecuencias que tienen distintas formas de producción agrícola de frutales sobre las comunidades microbianas del suelo rizosférico.

PALABRAS CLAVE:

DGGE, SUELOS FRUTALES, MANEJO ORGÁNICO Y CONVENCIONAL, REGIÓN ITS Y ADNr 16S.

ABSTRACT

Soil is one of the most complex and heterogeneous ecosystems due to its varied composition and abundant diversity of microorganisms. The characterization of the microbial communities that colonize this ecosystem has been limited because the classic methodologies only allow the study of a minimum percentage of the microbiology of the soil, the so-called cultivable microorganisms. In the present study the molecular technique Gel Electrophoresis with Denaturing Gradient (DGGE) was used to identify the differences and similarities in the characteristics of the microbial communities present in 5 pairs of soils cultivated with Andean fruit trees under two management systems: organic and conventional .

Were detected no significant differences in DGGE profiles in each pair of samples, which means that the fungal and bacterial communities are very similar in the soils with the two management systems. The ITS region equitability index was however higher in organic soils. However, the results obtained through this research will allow us to expand our knowledge about the consequences of different forms of agricultural production of fruit trees on the microbial communities of the rhizospheric soil.

KEYWORDS:

DGGE, FRUIT SOILS, ORGANIC AND CONVENTIONAL MANAGEMENT, ITS REGION AND 16S RNA.



ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	13
2. JUSTIFICACIÓN	15
3. OBJETIVOS	16
3.3.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	16
4. REVISIÓN DE LITERATURA.....	17
4.1. EL SUELO Y LOS MICROORGANISMOS	17
4.2. INFLUENCIA DEL MANEJO DE CULTIVO SOBRE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS	19
4.3. ESTUDIOS REALIZADOS A NIVEL LOCAL SOBRE EL TEMA.....	20
4.4. ESTUDIO DE COMUNIDADES MICROBIANAS DEL SUELO.....	20
4.4.1. <i>Métodos clásicos</i>	20
4.4.2. <i>Métodos moleculares</i>	21
4.5. FUNDAMENTOS DE LA TÉCNICA DE PCR.....	22
4.6. FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LA TÉCNICA DGGE.....	24
4.6.1. USO DE DGGE PARA LA CARACTERIZACIÓN DE COMUNIDADES MICROBIANAS	26
4.6.2. VENTAJAS DE DGGE	26
4.6.3. DESVENTAJAS DE DGGE	27
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
5.1.- ÁREA DE ESTUDIO Y EJECUCIÓN DEL PROYECTO.....	28
5.2.- SITIOS DE MUESTREO Y RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	28
5.3.- EXTRACCIÓN DE ADN.....	29
5.4.- PCR	30
5.5.- DGGE	33
5.6. ANÁLISIS FÍSICO Y QUÍMICO (pH, CE) DEL SUELO	34
5.7.- ANÁLISIS DE DATOS.	36



6. RESULTADOS	38
6.1. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO Y AMPLIFICACIÓN POR PCR	38
6.2. OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CORRIDA ELECTROFORÉTICA EN LA TÉCNICA DE DGGE.	40
6.2.1. <i>Optimización del protocolo para la Región 16S</i>	40
6.2.2. <i>Optimización del protocolo para la Región ITS</i>	44
6.3. ÍNDICES DE DIVERSIDAD	47
6.4. RESULTADOS DEL ANÁLISIS FÍSICO Y QUÍMICO (PH, CE) DE LOS SUELOS	50
6.5. DIFERENCIAS EN LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS SUELOS ORGÁNICOS FRENTE A LOS CONVENCIONALES	52
6.6. COMPARACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS DE LAS COMUNIDADES DE BACTERIAS Y HONGOS DE LOS SUELOS	54
7. DISCUSIÓN	59
8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	64
9. REREFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	66
10. ANEXOS	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de las muestras recolectadas.	29
Tabla 2. Concentración de los reactivos para PCR	31
Tabla 3. Perfil térmico para amplificar la región ITS (primer PCR).	32
Tabla 4. Perfil térmico para amplificar la región ITS (segundo PCR o PCR anidado)	32
Tabla 5. Perfil térmico para amplificar la región ADNr 16S	32
Tabla 6. Concentraciones de soluciones para el gel de poliacrilamida para la región ITS.....	33
Tabla 7. Concentraciones de soluciones para el gel de poliacrilamida para la región 16S.....	34
Tabla 8. Valores de los índices de diversidad obtenidos para la Región ADNr 16S.....	48
Tabla 9. Valores de los índices de diversidad obtenidos para la Región ADNr 16S.....	49
Tabla 10. Resumen de los resultados obtenidos del análisis físico y químico de las muestras de suelo.	51
Tabla 11. Valores obtenidos de las pruebas de significancia para las variables físicas y químicas.	52
Tabla 12. Valores obtenidos de las pruebas de significancia para los índices de diversidad.	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación a nivel provincial del área de estudio	28
Figura 2. ADN genómico extraído mediante el protocolo Powersoil DNA isolation kit en gel de agarosa al 1%.	38
Figura 3. Producto PCR amplificado con los cebadores ITS1F e ITS4.	38
Figura 4. Producto PCR anidado con los cebadores ITS1FGC e ITS2	39
Figura 5. Producto PCR para la región V3 del gen ARNs 16S (bacterias) con los cebadores 16SF y 16FR (450 pb).....	39
Figura 6. DGGE con poliacrilamida al 6% y gradiente desnaturizante de 30% a 80% (16S).	40
Figura 7. DGGE con poliacrilamida al 7% y gradiente desnaturizante del 40% a 70% (Izq.) y del 30% a 60% (16S).	41
Figura 8. DGGE con poliacrilamida al 7% y gradiente desnaturizante del 30% a 55% (16S).	42
Figura 9. DGGE final con poliacrilamida al 7% y gradiente desnaturizante del 35% a 55% (16S).	43
Figura 10. DGGE con poliacrilamida al 8% y gradiente desnaturizante del 30% a 50% (ITS).	44
Figura 11. DGGE con poliacrilamida al 8% y gradiente desnaturizante del 25% a 40% (ITS).	45
Figura 12. DGGE final con poliacrilamida al 8% y gradiente desnaturizante del 20% a 35% (ITS).	46
Figura 13. Agrupamientos jerárquicos aplicados a la región ITS. Complete Linkage (A), WPGMA (B), Simple Linkage (C), UPGMA (D), Neighbour Joining, (E)	55
Figura 14. Agrupamientos jerárquicos aplicados a la región ADNr 16S. Complete Linkage (A), WPGMA (B), Simple Linkage (C), UPGMA (D), Neighbour Joining, (E).....	57

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Diagrama de flujo sobre la extracción de ADN aplicando el kit Power Soil Insolation.	71
Anexo 2. Equipamiento utilizado en laboratorio para PCR y DGGE.....	72
Anexo 3. Parte de los huertos frutales de los que se tomaron las muestras. ..	73
Anexo 4. Componentes de Platinum PCR SuperMix.....	74
Anexo 5. Ficha descriptiva de la zona aplicada a cada sitio de muestreo.	74
Anexo 6. Encuesta de manejo e historial del sitio aplicada para cada muestra.	75
Anexo 7. Normalidad de las variables.	77
Anexo 8. Pruebas de normalidad para índices de diversidad en las muestras de suelo.....	78
Anexo 9.. Correlaciones entre las variables físicas de los suelos frente a los índices de diversidad.....	79
Anexo 10. Diagramas de dispersión entre las correlaciones.	80
Anexo 11. Perfiles DGGE para la región ADNr 16S.	83
Anexo 12. Perfiles DGGE para la región ITS.....	84

CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Yo, Carlos Antonio Riera Álvarez, autor de la tesis “Diversidad de las comunidades de bacterias y hongos en suelos de cultivos de frutales andinos bajo manejo orgánico y convencional”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, Enero del 2017



Carlos Antonio Riera Alvarez

C.I: 0106640725

DERECHOS DE AUTOR

Yo, Carlos Antonio Riera Alvarez, autor de la tesis "Diversidad de las comunidades de bacterias y hongos en suelos de cultivos de frutales andinos bajo manejo orgánico y convencional", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Ingeniero Agrónomo. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, Enero del 2017

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "C. A. Riera", written over a horizontal line.

Carlos Antonio Riera Alvarez

C.I: 0106640725

DEDICATORIA

A Dios por todas las bendiciones recibidas.

A mis padres, Julia y Carlos, por el esfuerzo y amor incondicional que siempre he recibido.

A mis hermanos, Katy, Fernando, Mary, Fanny, Diana y Daniel, por ser mi apoyo, mi ayuda y motivación, dándome la alegría que son mis sobrinos.

A toda mi familia, por ser mi más grande bendición.

Toño Riera

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, hermanos y todos mis seres queridos por estar siempre para mí, en todo momento.

A mi director de tesis, Blgo. Andrés Yarzábal Ph. D por la paciencia, motivación y disposición para impartir sus conocimientos para el éxito de ésta investigación.

A los Ingenieros Fernando Bermúdez, Javier Aguirre y Eduardo Chica, por invertir tiempo y sus conocimientos en la realización del presente trabajo.

A todos los docentes de la carrera de Ingeniería Agronómica de la Universidad de Cuenca, por compartir sus conocimientos para mi formación profesional.

A cada uno de mis amigos y compañeros de la carrera, por los gratos momentos compartidos y por ser el apoyo y la ayuda que he necesitado durante el tiempo de formación.

1. INTRODUCCIÓN

La microvida presente en los suelos es muy abundante y altamente diversa, lo que ha dificultado su estudio y caracterización (Torsvik y Øvreås 2002). De manera tradicional, la mayoría de estudios de éstas comunidades microbianas se han basado en la propagación *in vitro* y el mantenimiento de los microorganismos *cultivables* en medios de cultivo sintéticos o semi-sintéticos, sesgando así la información obtenida hacia aquellos grupos minoritarios de microorganismos capaces de crecer en éstos medios (Bernal 2006).

Estas limitaciones dificultan la caracterización adecuada de las comunidades microbianas (Prosser 2002), impidiendo además una correcta evaluación del posible efecto que podrían tener las variables ambientales (de origen antropogénico y natural) sobre la riqueza, diversidad y abundancia de las mismas (Torsvik y Øvreås 2002). En el caso particular de los suelos agrícolas, resulta importante determinar las posibles diferencias entre las comunidades presentes en suelos rizosféricos sometidos a manejo orgánico ó convencional, para poder establecer las bases científicas que permitan un manejo adecuado para la producción (Santa María et al. 2011).

En esta investigación se propuso Caracterizar las comunidades microbianas de los suelos sometidos a sistemas de manejo orgánico y convencional, a través del índice de diversidad de Shannon – Weaver usado en la ecología para medir la biodiversidad específica presente en un determinado ecosistema, su valor está entre 0,5 (baja diversidad) y 5 (alta diversidad). Índice de Riqueza que no es más que el número de especies existentes en un determinado hábitat, sin tomar en cuenta el número de individuos por especie, factor que el índice de Equitatividad si analiza, pues se encarga de determinar el grado de igualdad en la distribución de la abundancia de especies.

En nuestro país, la caracterización de las comunidades de microorganismos en los suelos se han basado casi exclusivamente en el estudio de las especies cultivables (Bernal 2006). En particular, para nuestra región, destacan los trabajos relacionados con hongos micorrizicos realizados en la Sierra ecuatoriana a través de medios de cultivo para Basidiomicetos y Ascomicetos (Paucar et al. 2011), en Colombia se comparó la estructura y diversidad de



comunidades fúngicas y bacterianas en suelos arroceros utilizando la técnica de DGGE (Landazábal 2013), dicha técnica también ha sido utilizada para medir el efecto del pastoreo en las comunidades bacterianas en los suelos de praderas uruguayas. (Bajsa 2008) De forma tal que existe aún mucha información que obtener sobre la diversidad microbiana en suelos agrícolas del Ecuador, más aún aquella que coloniza suelos cuya producción radica en frutales andinos (Bernal 2006).

2. JUSTIFICACIÓN

Las comunidades de microorganismos que habitan los suelos cumplen diversas funciones ecológicas, cuyo aprovechamiento contribuye al manejo sostenible del suelo como factor de producción agrícola (Flórez et al. 2013). Las labores agrícolas modifican el ambiente edáfico afectando directamente el desarrollo de las comunidades microbianas del suelo, causando algunas veces la pérdida de su funcionalidad y de los efectos benéficos que ejercen sobre los cultivos (Gonzalez Perez et al. 2014). En efecto, el tipo de manejo que se le dé al suelo puede originar diferencias importantes en el aprovechamiento de su microvida (Traina y Peters 1994).

En nuestro país, los cultivos de frutales en la región Interandina han venido evolucionando en superficie y producción; sin embargo aún mantienen un bajo rendimiento comparado con otras regiones (Vargas 2010). Tomando en cuenta que la producción de frutales andinos se basa en prácticas agronómicas mecanizadas, y que no se conocen las consecuencias de dichas prácticas sobre las comunidades microbianas del suelo (Vargas 2010), es importante realizar una caracterización de éstas comunidades para alcanzar una mejor comprensión acerca de los cambios que podría introducir el tipo de manejo sobre las mismas. Este conocimiento permitiría, además, contribuir al diseño de estrategias de manejo sustentable del suelo que permitan maximizar la productividad agrícola (Flores et al. 2013).

En éste proyecto se propone utilizar la técnica de biología molecular DGGE para estudiar y caracterizar las comunidades microbianas de suelos rizosféricos en cultivos frutales andinos sometidos a sistemas de manejo orgánico ó convencional. Considerando que la técnica de DGGE permite determinar algunas de las características más importantes de las comunidades microbianas en general, a bajo costo y de manera rápida, emplearemos ésta técnica para evaluar las posibles diferencias en cuanto a riqueza, diversidad y abundancia de las comunidades presentes en los suelos rizosféricos frutícolas andinos. Esto nos brindará información valiosa sobre los posibles efectos ocasionados por el tipo de manejo sobre las comunidades microbianas y, de manera indirecta, sobre la fertilidad del suelo y la productividad.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General.- Caracterizar las comunidades microbianas presentes en suelos andinos rizosféricos cultivados con frutales de la zona y sometidos a sistemas de manejo orgánico y convencional.

3.2.- Objetivos Específicos.-

- Determinar las características físicas en los suelos en estudio.
- Determinar índices de riqueza y diversidad de las comunidades de microorganismos que colonizan en suelos andinos cultivados con frutales de la zona bajo sistemas de manejo orgánico y convencional.
- Optimizar los parámetros de corrida electroforética al emplear la técnica de DGGE para el estudio de éstas comunidades microbianas.
- Comparar los parámetros de las comunidades microbianas que colonizan suelos andinos cultivados con frutales de la zona bajo dos sistemas de manejo: orgánico y convencional.

3.3.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existen diferencias en la riqueza y diversidad de las comunidades microbianas presentes en suelos rizosféricos cultivados con frutales andinos sometidos a dos tipos de sistemas de manejo, orgánico y convencional?

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. El suelo y los microorganismos

El suelo es uno de los ecosistemas más diversos y complejos que existen en la tierra (Anderson y Cairney 2004). Se estima que en 1 gramo de suelo existen alrededor de 100 a 2000 millones de microorganismos, entre bacterias, hongos y otros, de los cuales solo el 8% y el 1% respectivamente han sido identificados, esto se debe en gran medida al hecho que a que cerca del 99% de los microorganismos no son cultivables en medios artificiales o en condiciones de laboratorio (Nannipieri et al. 2003). Debido a esto, se hace muy difícil describir en forma precisa las comunidades microbianas que colonizan ambientes naturales –como el suelo- en cuanto a sus funciones y a las interacciones entre sus componentes (Drinkwater et al. 2014).

Para las ciencias agrícolas, el suelo representa la base para la producción y sus microorganismos están involucrados en procesos de descomposición de materia orgánica y ciclaje de nutrientes, sin los cuales prácticamente la productividad vegetal se vería seriamente limitada (Barrios 2007). Por otra parte, muchos de estos microorganismos son antagonistas de especies patógenas de plantas (Hernández et al. 2007). Tal es el caso de ciertas especies del género *Trichoderma* que es un hongo cosmopolita, habitante natural del suelo, capaces de producir enzimas que atacan o inhiben a hongos fitopatógenos convirtiéndolo en un excelente agente de biocontrol sobre todo para *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Sclerotium* y *Phytophthora* entre otros, que afectan muchos cultivos de interés comercial como maíz, cebolla, tomate, frijol, trigo, etc. (Michel et al. 2008).

La información que actualmente se dispone sobre la funcionalidad, composición, estructura, interacciones y posteriores aplicaciones de las comunidades microbianas de los suelos es limitada (Drinkwater et al. 2014). Como se mencionó anteriormente, los métodos tradicionales de cultivo están basados en el empleo de medios sintéticos, los cuales deben reunir las características nutricionales adecuadas para el desarrollo de los microorganismos, los cuales además deben ser cultivados en condiciones

óptimas de como temperatura, grado de humedad, pH, etc (Anderson y Cairney 2004). Sin embargo las grandes diferencias metabólicas y fisiológicas que existen entre distintos grupos de microorganismos determinan que tan solo una minoría de ellos sea capaz de multiplicarse en éstos medios (Santa María et al. 2011)

Es por ello que en las últimas décadas se han desarrollado métodos alternativos para facilitar la caracterización de la microbiología del suelo, métodos llamados “moleculares”, por estar basados en la extracción, purificación y análisis (incluyendo a veces la secuenciación) del ADN (van Bruggen y Semenov 2000).

Los estudios sobre la microbiología del suelo basados en métodos tradicionales han permitido de manera muy limitante determinar que entre los organismos con mayor abundancia en su respectivo orden están los procariotas, hongos, protozoarios y nematodos, siendo las bacterias las que más variabilidad presentan en lo que respecta a diversidad (Kozdrój y van Elsas 2000). Mientras que los estudios basados en métodos moleculares permiten reconocer la presencia de una gran diversidad de microorganismos en los suelos que hasta el momento de su ejecución eran desconocidos (Nogales 2005) .

Tradicionalmente los hongos micorrízicos y las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (incluyendo las fijadoras del nitrógeno) han sido el grupo más estudiado por el efecto benéfico que tienen sobre el desarrollo de las plantas (Lovera y Cuenca 2007; Calvo García 2011; Barrer 2009), sin embargo, como ya mencionó, estos resultados se refieren solamente al 1% de la microvida presente en el suelo, es decir, aquellas especies que se han logrado estudiar hasta la actualidad debido a que son capaces de crecer en esos medios de cultivo (Roesch et al. 2007). De tal forma que éstos estudios pasan por alto más del 99% de la biodiversidad microbiana presente en el suelo; de ahí que estos microorganismos sean conocidos como “la mayoría invisible” (Whitman et al. 1998).

4.2. Influencia del manejo de cultivo sobre las comunidades microbianas

En la agricultura se ha asociado el aumento de la biodiversidad del suelo con una producción vegetal adecuada, una reducción de la erosión, una mayor disponibilidad de nutrientes (macro y micro elementos), una mayor tolerancia a plagas y factores ambientales adversos, además de una mayor estimulación del correcto desarrollo y vitalidad de las especies vegetales (Torsvik y Øvreås 2002).

Lamentablemente, de manera general se ha podido poner en evidencia que los sistemas convencionales de producción agrícola, basados en la utilización de insumos sintéticos y maquinaria agrícola, tienen efectos negativos sobre la diversidad de las comunidades microbianas que colonizan el suelo (Torsvik y Øvreås 2002). En el extremo opuesto, uno de los principios para los sistemas de manejo orgánico es, precisamente, la vida en el suelo; por lo tanto, estos sistemas tratan de preservar la así llamada *salud biológica* del suelo, utilizando técnicas que preserven e incluso incrementen las poblaciones microbianas en el suelo (Drinkwater et al. 2014).

Un estudio comparativo realizado en Indonesia sobre la influencia de los sistemas de producción y la microbiología del suelo demostró que existen diferencias claras en lo que respecta a las poblaciones microbianas bacterianas y fúngicas, siendo más abundantes y diversas en los sistemas orgánicos (Moeskops et al. 2005);. Sin embargo Estudios llevados a cabo en Holanda, han demostrado que no existen diferencias significativas en lo que respecta a las comunidades microbianas de suelos provenientes de granjas orgánicas frente a las convencionales (Van Diepeningen et al. 2006). Mientras que en Brasil midiendo la respiración del suelo, demostraron que las prácticas de agricultura orgánica dan lugar a actividades microbianas del suelo en mayor medida, debido a la cantidad mayor de materia orgánica contenida frente al manejo convencional (Araujo et al. 2009) . El manejo orgánico aumenta la biomasa microbiana, mejorando la calidad del suelo. (Marinari et al. 2006). Vallejo et al. (2010) determinó que la diversidad y abundancia de las comunidades microbianas son menores en suelos cuyo manejo es convencional.

4.3. Estudios realizados a nivel local sobre el tema.

En Ecuador el cultivo de frutales representa importancia económica para el sector agrícola desarrollándose en mayor superficie en la región Costa, mientras que en mayor diversidad en la Sierra y en la Amazonía, destacándose en ésta última la producción de manzana y durazno, entre otros (Vilatu et al. 2010). A pesar de que se han realizado varios estudios sobre la microbiología del suelo en diferentes regiones de nuestro país, la gran mayoría se ha enfocado en ciertos grupos de microorganismos, tales como bacterias fijadoras de N y hongos micorrícicos (Bernal 2006). También se han reportado los efectos que tiene la contaminación ambiental sobre la microbiología de suelos en ambientes naturales, tales como los páramos (Paucar et al. 2011). Sin embargo, hasta la fecha, no se han publicado trabajos que relacionen el tipo de manejo con los cambios en la estructura de las comunidades microbianas del suelo para los cultivos en Ecuador.

4.4. Estudio de comunidades microbianas del suelo

4.4.1. Métodos clásicos

Recuentos de placas

Se trata de evaluar la diversidad mediante plaquetas y conteos viables directamente de la muestra, a través del cultivo de microorganismos, proporcionando información del componente heterotrófico activo de la población microbiana. Éste método es utilizado por su rapidez y bajo costo. El principal inconveniente en éste método es el bajo porcentaje de organismos cultivables que pueden generar sesgos hacia los individuos que se desarrollen rápidamente (Tabacchioni et al. 2000).

Perfil fisiológico de nivel comunitario (CLPP por sus siglas en inglés)

Evalúa la diversidad funcional potencial de las poblaciones bacterianas basándose en la fuente única de carbono, se usan placas con el medio de crecimiento + sal de tetrazolio + fuentes de carbono específicas del sitio a analizar las muestras, haciendo que la sal de tetrazolio cambie de color cuando el sustrato es metabolizado. Uno de los inconvenientes de ésta técnica es que

solamente representan una fracción cultivable de la comunidad, puesto que no todos los organismos son capaces de utilizar fuentes de carbono, favoreciendo únicamente a los organismos de rápido crecimiento (Classen et al. 2003).

Análisis de éster metílico de ácidos grasos

Este método no se basa en medios de cultivo, proporciona la información sobre la composición de las comunidades microbianas mediante las agrupaciones de ácidos grasos, diferenciando grupos taxonómicos importantes dentro de la comunidad, pues los ácidos grasos constituyen una proporción relativamente constante de la biomasa celular, haciendo que un cambio en dichos ácidos representarían cambios en los valores de la población microbiana como tal. Entre los inconvenientes que presenta es la sensibilidad a factores externos y a la densidad del inóculo, causando confusión en los resultados entre los organismos (Zelles 1999).

4.4.2. Métodos moleculares

RFLP (Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción)

Una vez extraído el ADN, es digerido por enzimas de restricción, las cuales dan fragmentos que se separan y visualizan por electroforesis, obteniendo patrones de bandas muy complejos, por lo que ésta técnica es mayormente utilizada en el estudio de polimorfismos de regiones particulares del ADN (Díaz Ruiz y Wachter Rodarte 2003).

RAPD (Análisis de ADN Polimorfo Amplificado al Azar) ó AP- PCR (PCR Cebado al Azar)

Amplifica enzimáticamente regiones de ADN escogiendo cebadores al azar que hibridan en loci de manera aleatoria por todo el genoma, revelando polimorfismos usados como marcadores en todo tipo de organismos (Guirao et al. 1994) .

AFLP (Polimorfismos de Longitud de Fragmentos Amplificados)

Usa la técnica de PCR utilizando enzimas de restricción por su especificidad, resolución y su capacidad de muestreo. Restringe el ADN con dos enzimas que producen dos extremos diferentes a los cuales se ligan adaptadores cortos como sitio de alineamiento de cebadores, amplificando de manera selectiva algunos de los fragmentos de restricción, utilizando condiciones estrictas para que amplifiquen exclusivamente los fragmentos en los que las extensiones del cebador coincida con los nucleótidos adyacentes, para posteriormente separar los fragmentos por electroforesis (Galeano 2012).

TGGE (Electroforesis en Gel con Gradiente de Temperatura)

Separa los fragmentos a través de un agente desnaturizante como lo es la temperatura, dichos fragmentos tienen la misma longitud pero con secuencias diferentes obtenidos a través de las amplificaciones de las regiones deseadas. A una temperatura de fusión adecuada la doble cadena de ADN se separa fundiendo total o parcialmente la molécula, disminuyendo la velocidad de migración en el gel (Díaz Ruiz y Wachter Rodarte 2003).

DGGE (Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturizante)

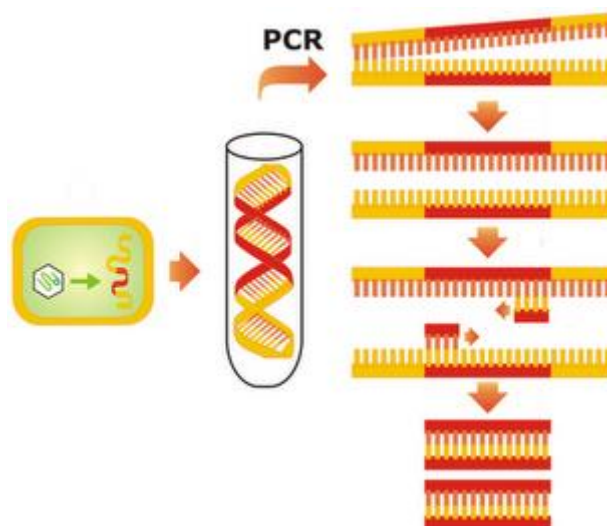
Tiene los mismos fundamentos que el TGGE, pero la gradiente se basa en concentraciones de urea y formamida. (Fundamentos se detallan mas adelante) (Schafer y Muyzer 2001).

4.5. Fundamentos de la técnica de PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), es una técnica que permite amplificar de manera muy específica una región de interés a partir de una molécula de ADN (Nocker et al. 2007).

Esta técnica se fundamenta en la capacidad de polimerización de una ADN polimerasa termoresistente, en presencia de cebadores (primers) específicos, los desoxirribonucleicos trifosfato (dNTPs) y una molécula molde (o blanco). Los cebadores son oligonucleótidos sintetizados de tal forma que complementen las secuencias colindantes de la región que se requiere amplificar, La amplificación se lleva a cabo a través de sucesivos pasos (o ciclos) de cambio de temperatura hasta obtener el producto deseado. Estos

pasos incluyen: una etapa de desnaturalización de la doble cadena de ADN, una etapa de hibridación (o anillamiento) en la que se hibridan los cebadores a las secuencias complementarias, una etapa de extensión en la que actúa la Taq polimerasa añadiendo dNTPs, y una etapa de elongación final que complementa cadenas incompletas (ver esquema 1).



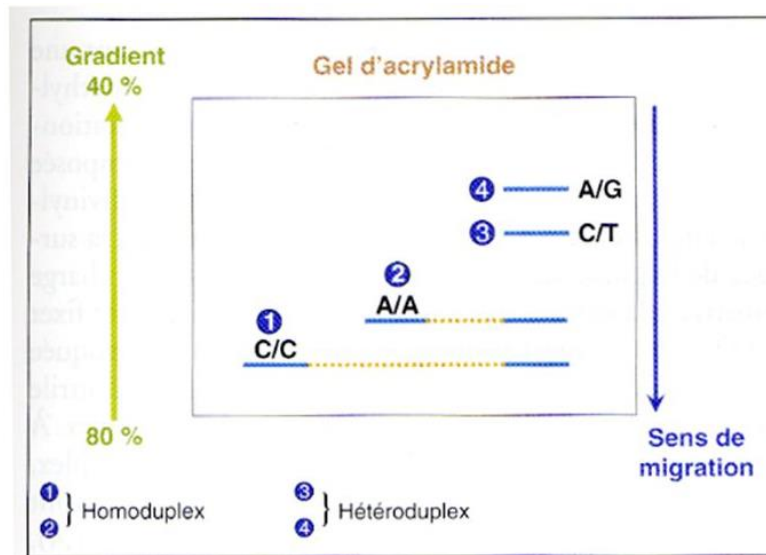
Esquema 1. Principios de la técnica PCR.

Fuente: biologia-alchu.blogspot.com/2010/09/reaccion-en-cadena-de-la-polimerasa-pcr.html

Durante la amplificación existe el riesgo de la aparición de artefactos, como por ejemplo la formación de heteroduplex (moléculas híbridas) o la amplificación de otras regiones del genoma.. Una de las causas que originan estos artefactos es un protocolo incorrectamente diseñado; otra de las causas es el empleo de cebadores “universales”, que son capaces de hibridizar con distintas regiones de los genomas empleados como ADN “blanco”. Una posible solución es el “re-acondicionamiento” del PCR, diluyendo el producto del primer PCR en un pre – mix limpio por tres ciclos de amplificación, lo que ha disminuido mas no eliminado la presencia de heterodúplexes (Thompson et al. 2002). Otra alternativa para obtener mayor especificidad es el uso de “Touch Down PCR” (TD - PCR). La misma consiste en la utilización de un perfil térmico que incluye un determinado número de ciclos con temperaturas de hibridación decrecientes, hasta alcanzar la temperatura adecuada para los ciclos restantes. De esta forma se evita la formación de dímeros o la amplificación de secuencias inespecíficas, (Korbie y Mattick 2008).

4.6. Fundamentos teóricos de la técnica DGGE

La Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE por sus siglas en inglés) es una técnica que permite diferenciar fragmentos de ADN de igual tamaño en base a su composición nucleotídica (Duarte et al. 2012). El fundamento de ésta técnica es la desnaturalización progresiva de las moléculas de ADN a lo largo de un gradiente desnaturalizante establecido en un gel de poliacrilamida, la cual es dependiente de la proporción de los distintos nucleótidos (A,T,G,C) en dichas moléculas (Myers et al. 1987). La desnaturalización total o parcial depende de las características físicas y químicas de las moléculas de ADN, cuya resolución en el gel se basa en la disminución de la migración durante la electroforesis. Esta disminución ocurre como consecuencia de una desnaturalización progresiva de las moléculas a consecuencia del incremento de la concentración de los agentes químicos desnaturalizantes (úrea y formamida). Los mismos actúan al formando puentes de hidrógeno con ciertas bases nitrogenadas, impidiendo el apareamiento normal de las mismas; como resultado, regiones ricas en GC se separan a mayores concentraciones de agente desnaturalizante en comparación con las regiones ricas en AT (Muyzer et al. 1993) (ver esquema 2).



Esquema 2. Principios de la técnica DGGE.

Fuente: <http://slideplayer.fr/slide/519778/>

El producto PCR da como resultado múltiples copias de todos los organismos cuyos fragmentos sean del mismo tamaño que la región de la cadena de ADN establecida, pero de diferente composición nucleotídica (diferentes especies) (Kanagawa 2003), por lo tanto cada fragmento tiene distinta movilidad electroforética en el gel de poliacrilamida con el gradiente creciente, pues cuando se da la desnaturalización de la doble cadena los fragmentos de ADN, frenan su migración, permitiendo diferenciar los fragmentos de igual tamaño, resultado que con la electroforesis convencional no es posible (Muyzer et al. 1993;.Ercolini 2004)

Cada banda que se marque en el gel es considerada como una OTUs (Unidad Taxonómica Operacional) distinta en la comunidad, mientras que la intensidad de la banda se considera la abundancia de la secuencia en la comunidad (Duarte et al. 2012).

La técnica DGGE previamente descrita requiere la amplificación de regiones del genoma que estén relativamente conservadas y distribuidas en forma universal. Entre estos marcadores moleculares destaca el gen que codifica para el ARNr 16S, asociado a la sub unidad ribosomal pequeña, que está universalmente distribuido y es muy conservado entre las especies de procariotas. Éste es un polirribonucleotido de cadena sencilla (1500 pb) a partir de cuyo análisis se puede obtener valiosa información sobre las relaciones filogenéticas entre seres vivos para así poder clasificar e incluso identificar a las distintas especies (Duarte et al. 2012). Por su parte, la región ITS (Internal Transcribed Spacer) está localizada entre los genes que codifican para el ARNr 18S y 28S en eucariotas. Esta región tiene una mayor variación de la secuencia (polimorfismo) entre especies fúngicas que estén estrechamente relacionadas, permitiendo diferenciarlas mediante la aplicación de la técnica DGGE (Hoshino 2011).

Es necesaria la optimización de la gradiente desnaturalizante para la comunidad a estudiar, es importante mencionar que ésta varía mucho dependiendo del fragmento de ADN amplificado (Janse et al. 2004).

4.6.1. Uso de DGGE para la caracterización de comunidades microbianas

En sus inicios, la técnica de DGGE se usaba principalmente para la detección de mutaciones puntuales en seres humanos; sin embargo, posteriormente se extendió al estudio de comunidades microbianas complejas. En efecto, la DGGE fue utilizado por primera vez para estimar la complejidad de comunidades microbianas de un *tapete* microbiano y biofilms bacterianos (Muyzer et al. 1993), mediante el análisis de un patrón de bandas que representaba el número de miembros predominantes en dichas comunidades (Muyzer et al. 1993). Mediante la secuenciación de las bandas extraídas a partir de los geles de DGGE se puede identificar a los miembros de las comunidades (Ercolini 2004).

Hasta el momento se han publicado una gran cantidad de artículos sobre comunidades microbianas en los cuales se ha utilizado la técnica DGGE para estudiar la ecología marina (Schafer y Muyzer 2001), la diversidad bacteriana en suelos tropicales (Peixoto et al. 2002). Incluso se han comparado las comunidades presentes en los diferentes perfiles de un mismo suelo (Agnelli et al. 2004). Igualmente se trata de una técnica ampliamente utilizada en la industria alimenticia para detectar contaminantes en los distintos alimentos (Ercolini 2004)

4.6.2. Ventajas de DGGE

La técnica de DGGE presenta grandes ventajas tanto en su equipamiento, tiempo, costos y resultados; entre éstas podemos destacar principalmente su gran sensibilidad para detectar heterocigotos cuando se estudian mutaciones y también para diferenciar los individuos presentes en una comunidad, pudiendo ser aplicada en varias ciencias donde la microbiología tenga alta relevancia (Duarte et al. 2012). Los reactivos utilizados presentan cierto nivel de toxicidad, por lo que es necesario cumplir con todas las normas establecidas dentro del laboratorio para su ejecución (Neilson et al. 2013).

Entre las ventajas relacionadas con su uso, también podemos destacar que la técnica de DGGE es relativamente rápida en cuanto a la generación de resultados (aproximadamente 24 horas desde el momento en que se han obtenido los productos de PCR); además no requiere del cultivo previo de los microorganismos ni tampoco requiere información previa acerca de la composición de especies de la comunidad analizada. Los resultados pueden ser analizados en forma cualitativa y semicuantitativa, permitiendo además analizar de manera simultánea varias muestras que estén o no relacionadas, lo que permite utilizar la técnica para examinar series temporales y dinámicas de las poblaciones microbianas (Muyzer et al. 1993).

4.6.3. Desventajas de DGGE

La principal desventaja que se presenta al momento del análisis de DGGE es la presencia de artefactos, cuya generación se da durante la amplificación de las cadenas de ADN en la técnica de PCR, lo que ha resultado un grave problema para los análisis de diversidad genética, UIUIU reconoce que éste fenómeno se da por errores en la TAQ polimerasa al momento (Janse et al. 2004).

Así también la presencia de bandas heteroduplex, pueden llegar a sesgar la investigación al ser tomados en cuenta para cuantificar la abundancia y/o diversidad de las comunidades microbianas estudiadas (Neilson et al. 2013).

La presencia de moléculas heteroduplex en las muestras amplificadas por PCR cuyo material aún no es conocido complica la interpretación de los resultados (Thompson et al. 2002). Cuando la técnica de PCR se utiliza para analizar diversidad genética presente en una comunidad de ADN, las moléculas heteroduplex podrían representar una gran fracción en el producto final (Janse et al. 2004)..

No existe alguna explicación exacta referente a la presencia de éstas bandas, pero puede deberse que durante cada ciclo de PCR algún producto secundario se forma debido a la detención prematura de la elongación, además de las combinaciones particulares de los fragmentos de genes y cebadores (Janse et al. 2004).

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1. ÁREA DE ESTUDIO Y EJECUCIÓN DEL PROYECTO

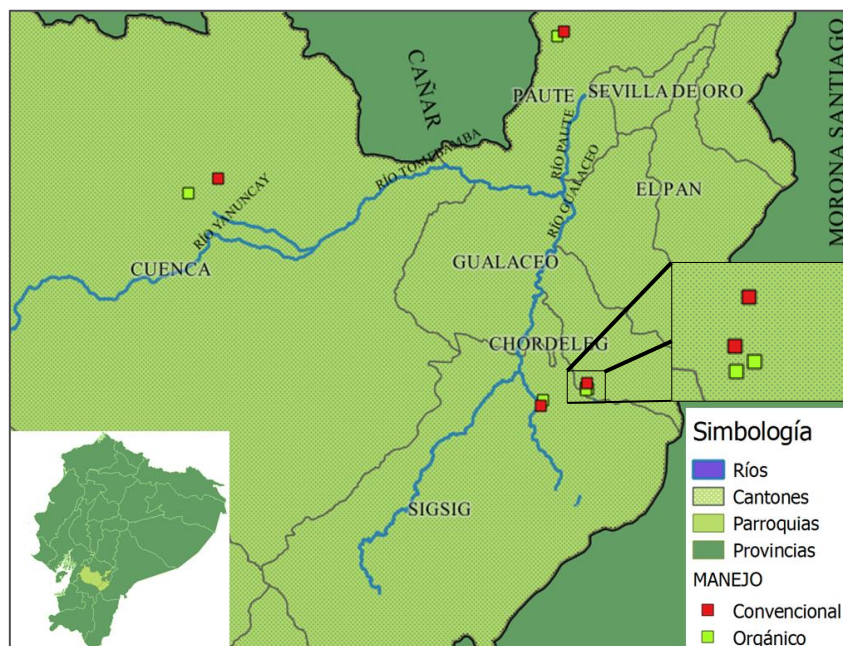


Figura 1. Ubicación a nivel provincial del área de estudio

Elaborado por: Carlos Riera

Fuente: IGM

5.2. SITIOS DE MUESTREO Y RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Se seleccionaron 5 pares de suelos para realizar los muestreos, correspondientes a campos de frutales andinos bajo manejo orgánico y convencional ubicados en los cantones Sigüig, Chordeleg, Paute y Cuenca, todos pertenecientes a la provincia del Azuay (Figura 1). Entre los cultivos presentes están manzana, tomate de árbol y durazno. Los pares de suelos muestreados fueron georeferenciados y ubicados lo más cercanamente posible el uno del otro para minimizar variaciones ambientales, geológicas y edáficas. Las muestras fueron colectadas durante el mes de mayo. En cada sitio de muestreo se colectaron 200 gramos de suelo para la extracción de ADN genómico y 2 kg para el análisis físico, utilizando los métodos tradicionales de recolección. Posteriormente, se almacenaron en frascos de vidrio a -20°C para su conservación en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, mientras que a las muestras restantes se les aplicaron las pruebas respectivas para obtener los

resultados sobre su análisis físico en el laboratorio de suelos de la misma facultad.

En cada sitio de muestreo se aplicaron además encuestas a los dueños de las parcelas sobre la fisiografía e historial de manejo del suelo para corroborar la información.

Se utilizó la siguiente codificación para identificar las muestras:

Tabla 1. Descripción de las muestras recolectadas.

PARES	CÓDIGO	MANEJO	UBICACIÓN	CULTIVO
1	1047	Orgánico	Principal	Manzana, durazno
	1046	Convencional	Principal	Manzana, durazno
2	1048	Orgánico	Sayausí	Tomate de árbol, manzana
	1049	Convencional	Sayausí	Tomate de árbol, manzana
3	1050	Orgánico	Sigsig	Manzana, durazno
	1051	Convencional	Sigsig	Manzana, durazno
4	1052	Orgánico	Principal	Manzana, durazno, mora
	1053	Convencional	Principal	Manzana, durazno, mora
5	1054	Orgánico	Paute	Manzana, durazno
	1055	Convencional	Paute	Manzana, durazno

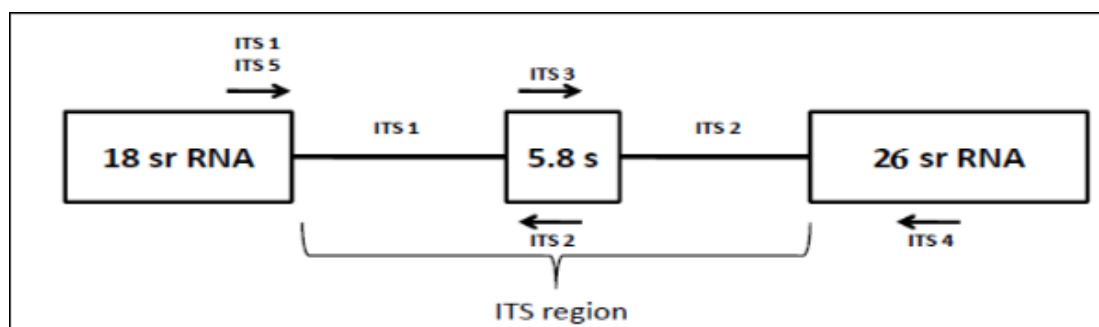
5.3. Extracción de ADN

El ADN total (ADN ambiental o metagenómico) presente en las muestras de suelo colectadas fue extraído usando el kit de extracción de ADN de suelos Powersoil® DNA isolation kit (Mobio, Carlsbad, CA, EE.UU) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Una vez seguido el protocolo, se verificó la presencia y la integridad del ADN en geles de agarosa al 1%. Para ello se mezclaron 5 µl de cada muestra con 0,5 µl de SYBR Green (colorante intercalante) y 0,5 µl de tampón de carga comercial (Blue Juice) en cada pozo. Las muestras restantes fueron almacenadas en microtubos de 1,5 ml (*Eppendor*) a -20°C. La corrida electroforética se realizó a temperatura ambiente, a voltaje constante (100 V) y durante 30-45 minutos, al cabo de los cuales se observó el gel en transiluminador UV. Las imágenes fueron registradas con una cámara digital.

5.4. PCR

Una vez extraído y purificado el ADN metagenómico de cada una de las muestras de suelo, se realizó la amplificación por PCR de las regiones ADNr 16S (bacterias) e ITS (hongos), utilizando cebadores “universales”.

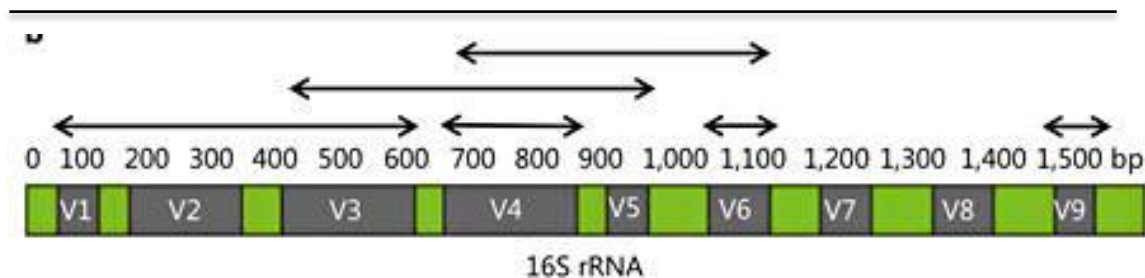
Para amplificar la región ITS (hongos) los cebadores utilizados fueron ITS1F (5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTAA-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TATGC-3') (Liu et al. 2015). Para incrementar la especificidad de la reacción de amplificación, se realizó una segunda reacción de amplificación empleando los productos de la primera como ADN blanco (PCR anidada). En este caso se emplearon los cebadores ITS1FGC (5'- CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCT TGG TCA TTTA GAG GAA CTAA-3') e ITS2 (5' – GCTGCGTTCTTCATCGATGC -3' (Wu et al. 2013) (Esquema 3). Una cola GC fue añadida al cebador ITS1FGC para formar una grapa GC en los productos amplificados, de manera que evite la desnaturalización completa de los fragmentos amplificados.



Esquema 3. Región genómica que incluye la ITS.

Fuente: ijser.org/paper/EcoRV-digestion-patterns-in-ITS-region-of-medicinal-plants.html

En el caso de las bacterias, se amplificó la región V3 del gen que codifica para el ARNr 16S utilizando los cebadores IF968-GC (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCCCCGCCCCAACGCGAAGAACCTTAC-3') y 1401R (5' CGG TGT GTA CAAGACCC-3') (Brons y van Elsas2008). En esta ocasión se empleó un solo paso de amplificación.



Esquema 4. Región genómica V3 (500 pb).

Fuente: https://www.researchgate.net/figure/258314499_fig1_Figure-2-Identification-of-bacteria-during-454-Life-Sciences-sequencing-a-A-fragment

Una cola GC fue añadida a los cebadores ITS1FGC y IF968-GC para formar una grapa GC en los productos amplificados, de manera que evite la desnaturalización completa de los fragmentos amplificados.

En ambos casos se utilizó una polimerasa modificada covalentemente, incluida en el kit comercial Platinum PCR SuperMix (Invitrogen) según las siguientes especificaciones:

Tabla 2. Concentración de los reactivos para PCR

Reactivo	Concentración final
Buffer	1 x
MgCl ₂	2,5 mM
dNTPs	0,5 mM
Primer A	0,2 mM
Primer B	0,2 mM
Taq DNA Polimerase	1 unidad/20µm

Para la amplificación se utilizó un termociclador Eppendorf (Musleucicler II), con condiciones de reacción diferentes para cada grupo de organismos según se indica en las tablas 3, 4 y 5.

Tabla 3. Perfil térmico para amplificar la región ITS (primer PCR).

Etapas	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización		94°C	5 min
Hibridación	10	94°C	30 seg
		65°C	30 seg
		72°C	30 seg
		94°C	30 seg
Extensión	25	55°C	30 seg
		72°C	30 seg
		72°C	30 seg
Elongación		72°C	7 min
Conservación		4°C	

Reducción de 1°C en cada ciclo (Touchdown)

Fuente: Liu et al.(2015)

Tabla 4. Perfil térmico para amplificar la región ITS (segundo PCR o PCR anidado).

Etapas	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización		94°C	4 min
Hibridación	30 ciclos	94°C	45 seg
		55°C	1 min 15 seg
		72°C	1 min
		72°C	5 min
Extensión		72°C	5 min
Conservación		4°C	

Fuente: Wu et al.(2013)

Tabla 5. Perfil térmico para amplificar la región ADNr 16S.

Etapas	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial		94°C	5 min
Desnaturalización	10 ciclos	94°C	1 min
		65°C	1 min
		72°C	2 min
Hibridación	25 ciclos	94°C	1 min
		55°C	1 min
		72°C	2 min
		72°C	30 min
Extensión		72°C	30 min
Conservación		4°C	

Reducción de 1°C en cada ciclo (Touchdown)

Fuente: Brons y van Elsas (2008)

Para verificar la correcta amplificación de las regiones esperadas, los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 1% utilizando también el producto comercial *TrackIt™ 1 kb Plus DNA Ladder* para determinar los pares de bases amplificados. Una vez comprobadas la presencia de las bandas esperadas, los productos de PCR se almacenaron en microtubos de 1,5 ml a -20°C.

5.5. DGGE

Los productos de amplificación obtenidos en las etapas anteriores fueron separados mediante la técnica de DGGE.

Para ello fue necesario optimizar las condiciones de corrida electroforética, particularmente en lo que concierne a la concentración de acrilamida del gel y al gradiente de agentes desnaturizantes, haciendo diferentes ensayos conforme iban mejorando los resultados, hasta obtener las concentraciones óptimas. Cabe señalar que para los distintos ensayos las muestras provenían de suelos que no pertenecían a ésta investigación, ya que no se contaba con el material a estudiar suficiente, pero su ADN fue extraído con la misma técnica.

Se realizaron alrededor de 8 ensayos en conjunto para las diferentes regiones a analizar.

Región ITS

Se utilizó un gel de poliacrilamida al 8% con un gradiente desnaturizante del 20% a 35% (Tabla No. 6).

Tabla 6. Concentraciones de soluciones para el gel de poliacrilamida para la región ITS

Gradiente desnaturizante	Acrilamida 40%	TAE 50x	Formamida	Úrea	H ₂ O CSP
20%	10 ml	0,5 ml	4 ml	4,2 g	50 ml
35%	10 ml	0,5 ml	7 ml	7,35 g	50 ml

Región ADNr 16S

Se utilizó un gel de poliacrilamida al 7% con un gradiente desnaturalizante del 35% a 55% (Tabla No. 7).

Tabla 7. Concentraciones de soluciones para el gel de poliacrilamida para la región 16S

Gradiente desnaturalizante	Acrilamida 40%	TAE 50x	Formamida	Úrea	H ₂ O CSP
35%	8,75 ml	0,5 ml	7 ml	7,35 g	50 ml
55%	8,75 ml	0,5 ml	11 ml	11,55 g	50 ml

Las muestras correspondientes a los productos de PCR almacenados a -20°C (10 µl del producto anidado (ITS) y 15 µl del producto 16S) fueron mezcladas con 3 µl de *BlueJuice* y depositadas en los pocillos correspondientes en la parte superior del gel de DGGE.

La electroforesis se realizó en tampón TAE 0.5X, a una temperatura constante de 60°C a 80 V durante 16 horas en un equipo electroforético *BioRad*.

Una vez transcurrido este periodo de tiempo, para teñir las bandas se aplicó directamente sobre el gel de poliacrilamida 15 ml de TAE 0.5X conteniendo 3 ml de SYBR Green, durante 30 min en un ambiente totalmente oscuro.

Una vez teñidas las bandas los geles fueron digitalizados utilizando un foto documentador GelDoc XR (Biorad) para su análisis posterior.

5.6. Análisis físico y químico (pH, CE) del suelo

Para determinar la densidad aparente de los suelos se utilizó el método conocido como “cilindro biselado” (Blake y Hartge 1986). Para ello, se introdujeron directamente sobre el suelo rizosférico, a una distancia entre 20 a 30 cm de los tallos de las plantas los anillos de *Kopecky* para colectar un volumen de 90,48 cm³; las muestras así colectadas se transportaron al laboratorio a temperatura ambiente y posteriormente fueron secadas a una

temperatura de 105°C por 24 horas. Las muestras fueron posteriormente pesadas, para determinar la densidad aparente dividiendo el peso seco de la muestra para el volumen de la misma.

La densidad real fue determinada por el método del *Picnómetro* (Forsythe 1985). Para ello se pesó primeramente el picnómetro vacío (P_v) y luego aforado completamente con agua (P_a). Seguidamente en el mismo picnómetro se introdujeron 2 gr de suelo seco (M_s), se aforó el resto del volumen del picnómetro con agua y nuevamente se pesó (P_T).

Una vez obtenidos todos los valores, se aplicó la siguiente fórmula para obtener el valor de la densidad real de cada muestra.

$$DR = \frac{M_s}{(P_a - P_v) - (P_t - P_v)}$$

Para el cálculo del porcentaje del contenido de materia orgánica se utilizó el método de ignición (Schumacher 2002), utilizando 10 gr de suelo seco de cada muestra incubadas en la estufa (Mufla) a 400°C por 16 horas, y calculando luego el contenido de materia orgánica, basándonos en la pérdida de peso debido a la ignición.

Para obtener los resultados de textura de cada muestra de suelo, definida como la cantidad relativa expresada en % de arena (2 a 0,063 mm de diámetro), % de limo (0,063 a 0,002 mm de diámetro) y % de arcilla (< 0,002 mm diámetro) (Sánchez y del Blanco 1995) se realizó utilizando el método de hidrómetro (Bouyoucos 1961). El método consistió en preparar una suspensión de suelo (20 gr) con 20 ml de agente dispersante (10 gr $(\text{NaPO}_3)_6$ + 250 ml de agua) y 400 ml de agua que se mezcló durante 5 minutos, Ésta mezcla se pasó por un tamiz #63 para separar la fracción de arena; luego se colocó la solución tamizada en una probeta y se aforó con agua hasta 1000 ml, se tapó y se agitó vigorosamente. La probeta se sumergió en el tanque de dispersión el cual se mantuvo a una temperatura de 20°C, antes que transcurran 50 segundos se sumergió el hidrómetro dentro de la probeta y se registró el valor que marcó una vez estabilizado el hidrómetro. Repitiendo el último paso a los 5 minutos, 2, 16 y 24 horas registrando los valores correspondientes una vez que el

hidrómetro se haya estabilizado. Los cálculos posteriores se realizaron aplicando la fórmula planteada por Bouyoucos (1961).

Para determinar los valores del pH (potencial Hidrógeno) y la conductividad eléctrica (CE) se realizó utilizando un medidor de pH (potenciómetro) y un conductímetro respectivamente. Para ello se pesaron 100 gr de cada muestra y se añadió 100 ml de agua destilada, agitando durante 10 min con un agitador magnético para homogenizar la muestra. Luego se introdujeron los sensores por separado esperando aproximadamente 1 min hasta estabilizar el sensor, y entonces se registraron los valores respectivos para el pH y CE.

5.7. Análisis de datos.

A partir del análisis de las imágenes de los geles, se determinaron los siguientes parámetros: riqueza, índice de equitatividad e índice de Shannon – Weaver a través de los valores de “RAW volumen” calculados en el programa bioinformático Gel Analyzer. El índice de diversidad de Shannon [$H' = \sum S = 1(p_i)(\log^2 p_i)$] se determinó calculando los valores S y p_i , donde, S = número de bandas en cada carril y p_i = proporción entre la intensidad de una banda específica y la suma de la intensidades de todas las bandas de un mismo carril (Guanghua et al. 2008), De este modo, el número de bandas por carril, S, corresponde a la riqueza.

Posteriormente, a partir de los resultados obtenidos correspondientes a las comunidades de todos los suelos muestreados, se compararon las estructuras de las comunidades de bacterias y hongos usando un análisis jerárquico utilizando los algoritmos: UPGMA, *Neighbour Joining*, *Single Linkage*, *Complete Linkage* y WPGMA usando el software PyElph versión 1.4. Se debe resaltar el hecho que no fueron las bandas en su totalidad dadas por el DGGE analizadas, sino aquellas mayormente representativas (para evitar excluir heteroduplex en el análisis). Para determinar las bandas a analizar y las que se descartaron, se realizó un consenso entre cuatro revisores de la imagen dada. Las imágenes resultantes directamente del foto documentador se pueden apreciar en los anexos 11 y 12.



Para contrastar la normalidad del conjunto de datos para cada una de las variables se utilizó la prueba No Paramétrica de Shapiro – Wilk debido a su eficacia en muestras pequeñas.

El análisis de los datos de los resultados físicos – químicos y las medias de los valores obtenidos en los índices de diversidad, se realizó aplicando un test de la *t de Student*, en el caso de que los datos se distribuyan como una normal, o una *U-Mann-Whitney* en caso contrario (Anexos 7 y 8), en software IBM SPSS Estistisc 22.

6. RESULTADOS

6.1. Extracción de ADN genómico y amplificación por PCR

Inicialmente se extrajo el ADN metagenómico o ambiental directamente a partir de las muestras del suelo, mediante el protocolo previamente mencionado.

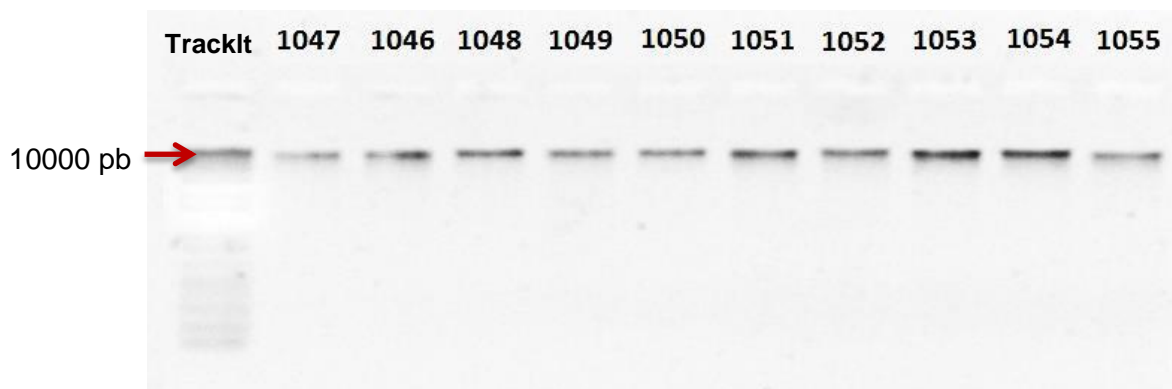


Figura 2. ADN genómico extraído mediante el protocolo Powersoil DNA isolation kit en gel de agarosa al 1%.

Se puede observar la presencia de bandas discretas, de una longitud molecular aproximada 10.000 pb y cuya intensidad es uniforme, aunque se presentan ligeras diferencias. Esto indica no solamente que el método de extracción y purificación funcionó correctamente, sino que el ADN obtenido era de buena calidad y no presentaba degradación aparente.

A partir de este ADN metagenómico se amplificaron los marcadores especificados anteriormente (16S ADNr y región ITS); para verificar la efectividad de la amplificación, los productos finales se evaluaron en un gel de agarosa al 1%,

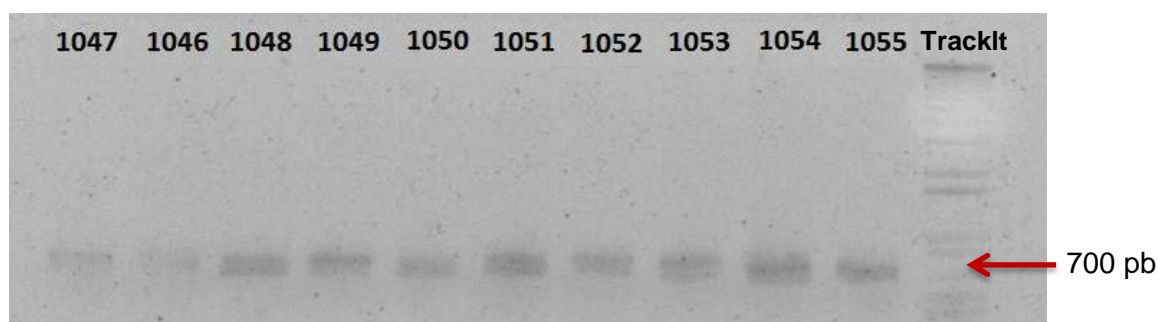


Figura 3. Producto PCR amplificado con los cebadores ITS1F e ITS4.

En primer lugar, destaca la presencia de bandas de aproximadamente 700 pb en todas las muestras. En algunos casos, se observa que existe una baja

intensidad en las bandas amplificadas. De igual forma, es evidente la presencia de bandas dobles en todos los casos. Sin embargo, se puede apreciar claramente que el protocolo empleado permitió obtener resultados positivos.

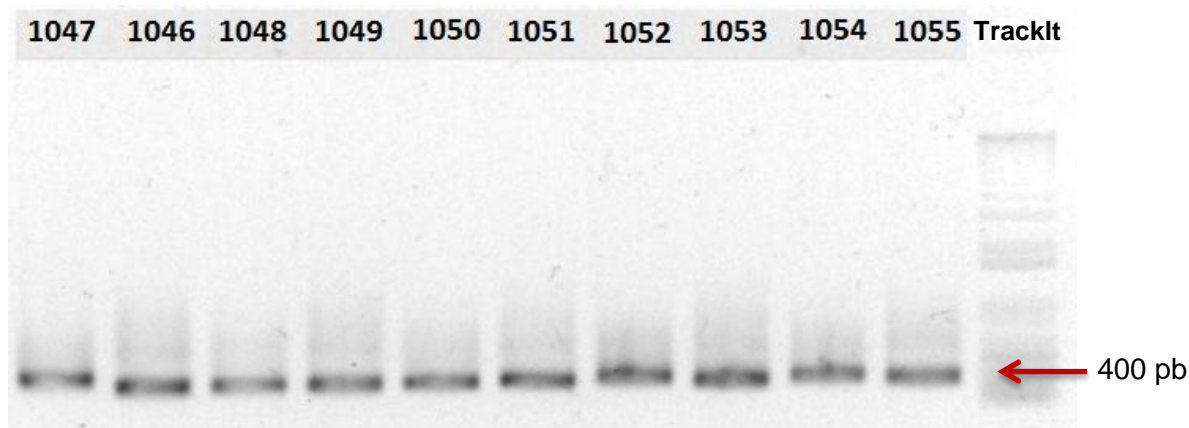


Figura 4. Producto PCR anidado con los cebadores ITS1FGC e ITS2

Empleando los productos del primer PCR, como se especificó en la parte metodológica, se realizó un segundo PCR anidado empleando un segundo par de cebadores. Como se observa en la figura 4, los productos de amplificación, de 450 pb aproximadamente, son uniformes, tanto en su longitud molecular como en intensidad. Sin embargo, se pueden apreciar ligeras diferencias en cuanto al tamaño de los amplicones.

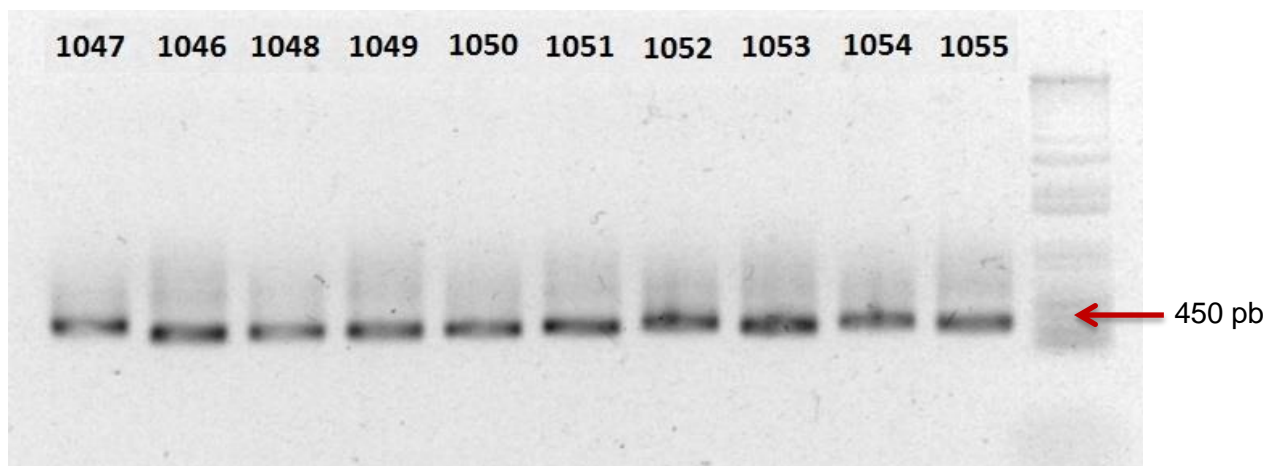


Figura 5. Producto PCR para la región V3 del gen ARNs 16S (bacterias) con los cebadores 16SF y 16FR (450 pb).

En el caso de la amplificación del gen ADNr 16S, los resultados obtenidos permiten comprobar una evidente uniformidad en el tamaño de los fragmentos (450 pb aproximadamente) y la intensidad de las bandas.

6.2. Optimización de los parámetros de corrida electroforética en la técnica de DGGE.

Con la finalidad de determinar el gradiente óptimo de úrea y formamida así como la concentración de poliacrilamida, para permitir una mejor separación de los fragmentos amplificados de ADN, se realizaron diferentes pruebas variando las concentraciones de úrea – formamida, así como también de acrilamida. Esto se hizo tanto para el gen 16S ADNr como para la región ITS.

6.2.1. Optimización del protocolo para la Región 16S

En la primera prueba se evaluaron geles de poliacrilamida al 6% con un gradiente desnaturalizante del 30% a 80%.

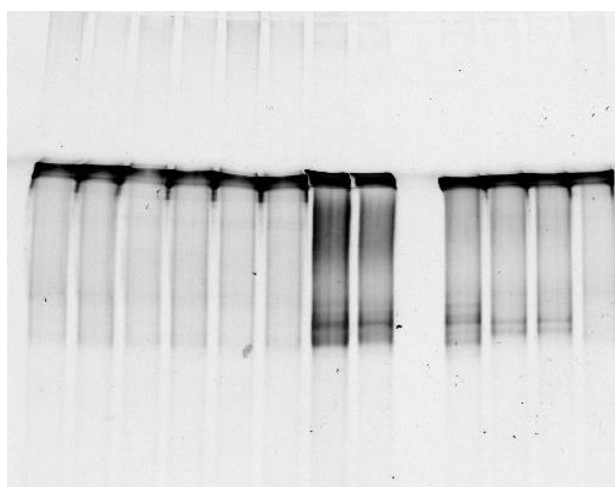


Figura 6. DGGE con poliacrilamida al 6% y gradiente desnaturalizante de 30% a 80% (16S).

Como se observa, la definición y la separación de las bandas es bastante baja, existiendo una compresión de las mismas en el tercio superior del gel, lo que invalida el uso de éste gradiente..

Para la siguiente prueba se decidió aumentar la concentración de acrilamida a 7%, y trabajar con un gradiente desnaturalizante de 40% a 70%.

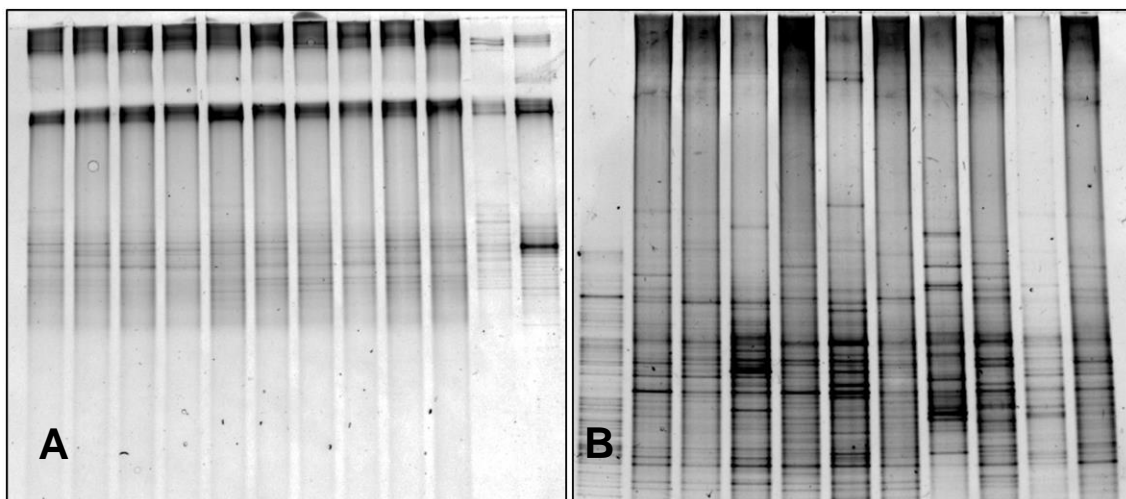


Figura 7. DGGE con poliacrilamida al 7% y gradiente desnaturalizante del 40% a 70% (Izq.) y del 30% a 60% (16S).

Los resultados obtenidos en esta prueba (Figura 7A) permiten confirmar una mejora en la definición de las bandas; sin embargo aún existe una compresión de las mismas en la parte superior del gel, mientras que en la parte baja no se delimitan correctamente las bandas.

Continuando con la optimización, ensayamos un tercer gradiente desnaturalizante (30-60%) con la misma concentración de acrilamida. La Figura 7B muestra una notable mejora, tanto en la definición como la intensidad de las bandas, permitiendo establecer un número determinado de las mismas para cada carril; sin embargo es evidente que las bandas se separan en la mitad inferior del gel, estando casi ausentes en la mitad superior.

Es por ello que se decidió modificar ligeramente el gradiente de agentes desnaturalizantes a 30% - 55%, manteniendo la misma concentración de acrilamida (7%).

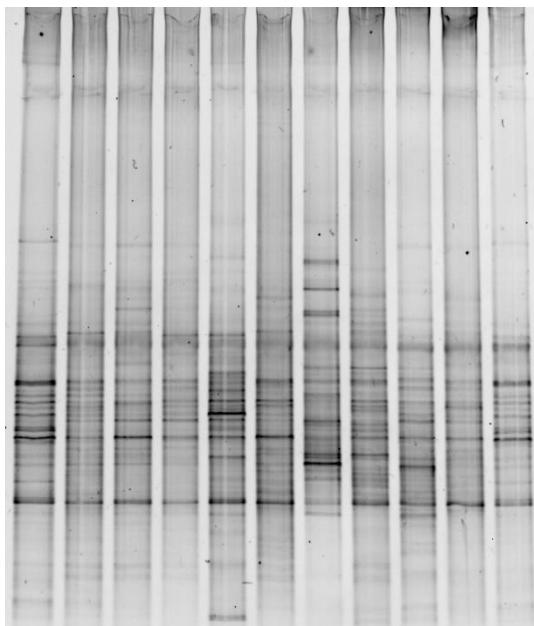


Figura 8. DGGE con poliacrilamida al 7% y gradiente desnaturizante del 30% a 55% (16S).

Los resultados de este último ensayo (Figura 8) muestran una mejora absoluta en la definición de las bandas, pero sigue existiendo un espacio vacío en la parte superior, lo cual puede ser aprovechado modificando el gradiente.

En base a éste resultado se ajustó levemente el gradiente desnaturizante a 35% - 55%. En vista a los resultados obtenidos (Figura 9) se decidió usar este gradiente como protocolo óptimo para realizar la presente investigación.

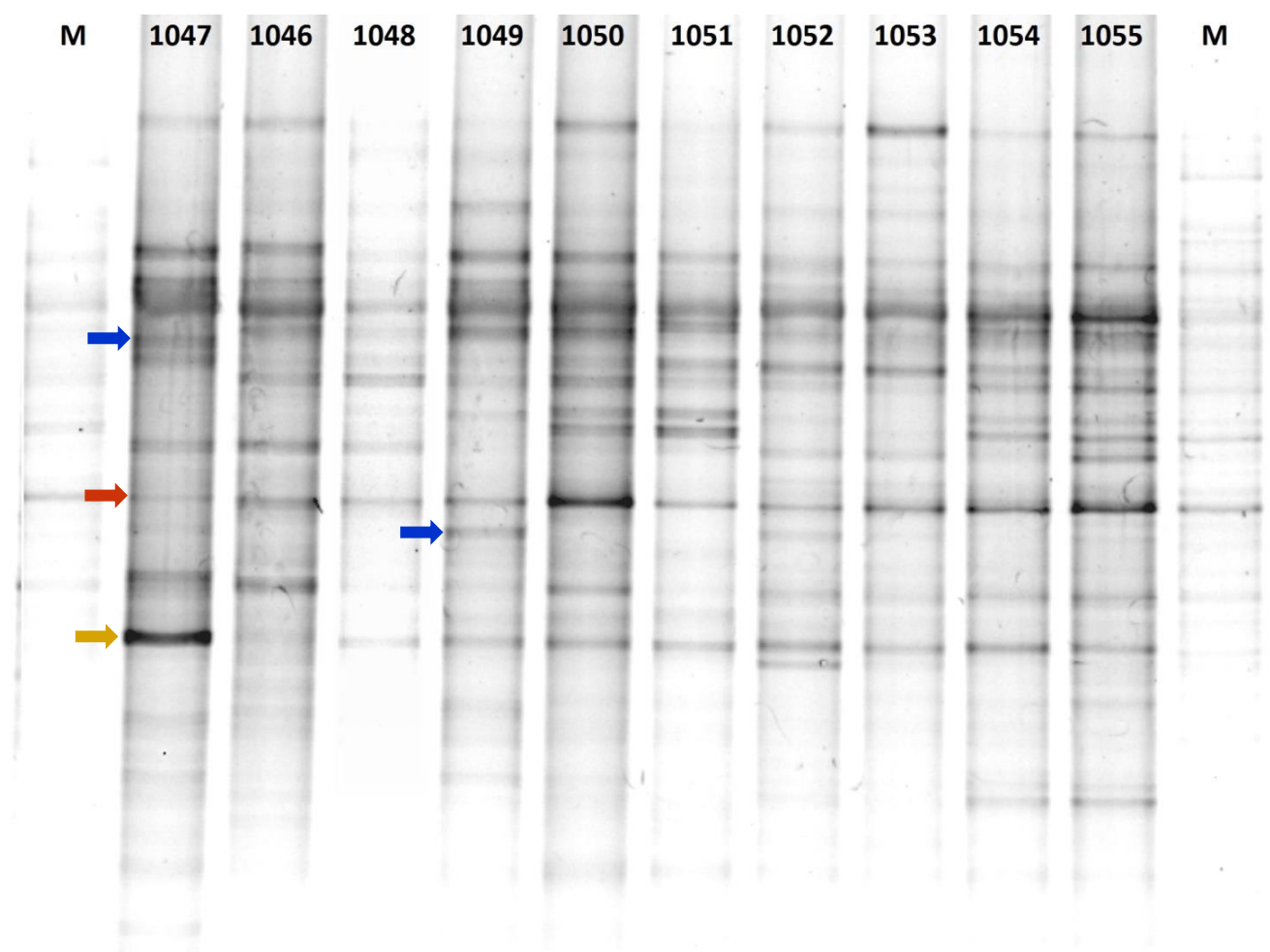


Figura 9. DGGE final con poliacrilamida al 7% y gradiente desnaturalizante del 35% a 55% (16S).

→ Banda con mayor intensidad. → Banda única. → Banda presente en todos los perfiles.

Se observa que existe uniformidad respecto a las bandas en cada carril, sin embargo se dan ciertas diferencias con respecto a la posición e intensidad de banda, existe una media de 14 bandas por carril, el carril 1047 posee cuatro bandas que no se repiten en los otros (Banda N° 5, 6, 11 y 13), los carriles 1048, 1051, 1052 y 1055 poseen una sola banda irrepetible (banda N° 8, 10, 14 y 13 respectivamente), mientras que en los demás carriles no existen bandas únicas, aunque se da el caso de que la banda N° 2 del carril 1046 se repite en los carriles 1049 y 1053, siendo éstas tres muestras provenientes de suelos convencionales, podría tratarse de una comunidad influenciada por el manejo.

En lo que respecta a la intensidad de bandas, no existe variabilidad (visualmente) destacable exceptuando las bandas número 3 y 11 del carril 1047, la banda número 11 del carril 1050, las bandas número 1 y 11 del carril 1053 y las bandas 3 y 10 del carril 1055, cuya intensidad representa mayor número de individuos por especies.

6.2.2. Optimización del protocolo para la Región ITS

Siguiendo una estrategia similar a la anteriormente descrita, comenzamos por emplear un gel de poliacrilamida al 8% con un gradiente desnaturante del 30% a 50%.

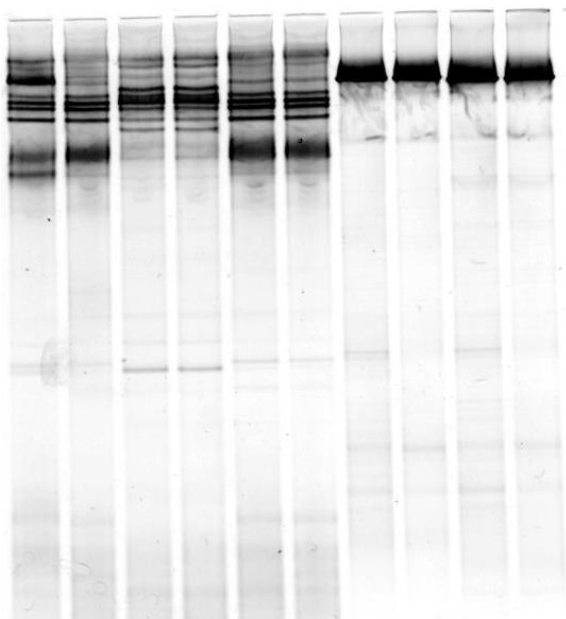


Figura 10. DGGE con poliacrilamida al 8% y gradiente desnaturante del 30% a 50% (ITS).

Se observa que la definición de las bandas es buena (Figura 10); sin embargo en la parte inferior la resolución es mucho menor que la superior, debido a la compresión de las bandas.

Se decidió disminuir el rango del gradiente desnaturante a 25% - 40%, con un gel de poliacrilamida al 8% nuevamente.

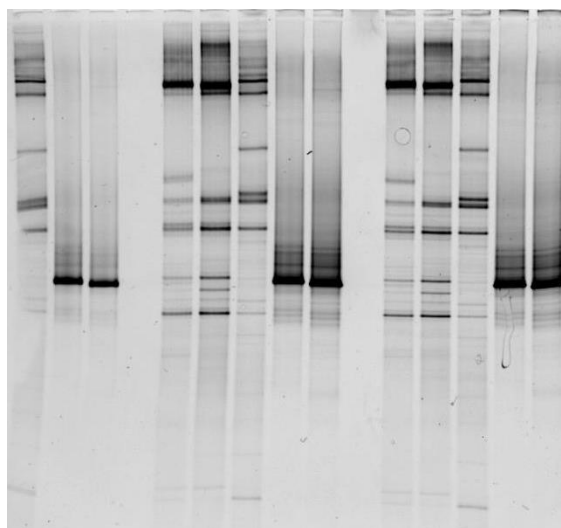


Figura 11. DGGE con poliacrilamida al 8% y gradiente desnaturizante del 25% a 40% (ITS).

Se observa una clara diferencia con la imagen anterior (Figura 11), pero aún existe baja definición de las bandas en algunos canales, por lo que se decidió modificar levemente éste gradiente desnaturizante a 20% - 35%, manteniendo el gel de poliacrilamida al 8%.

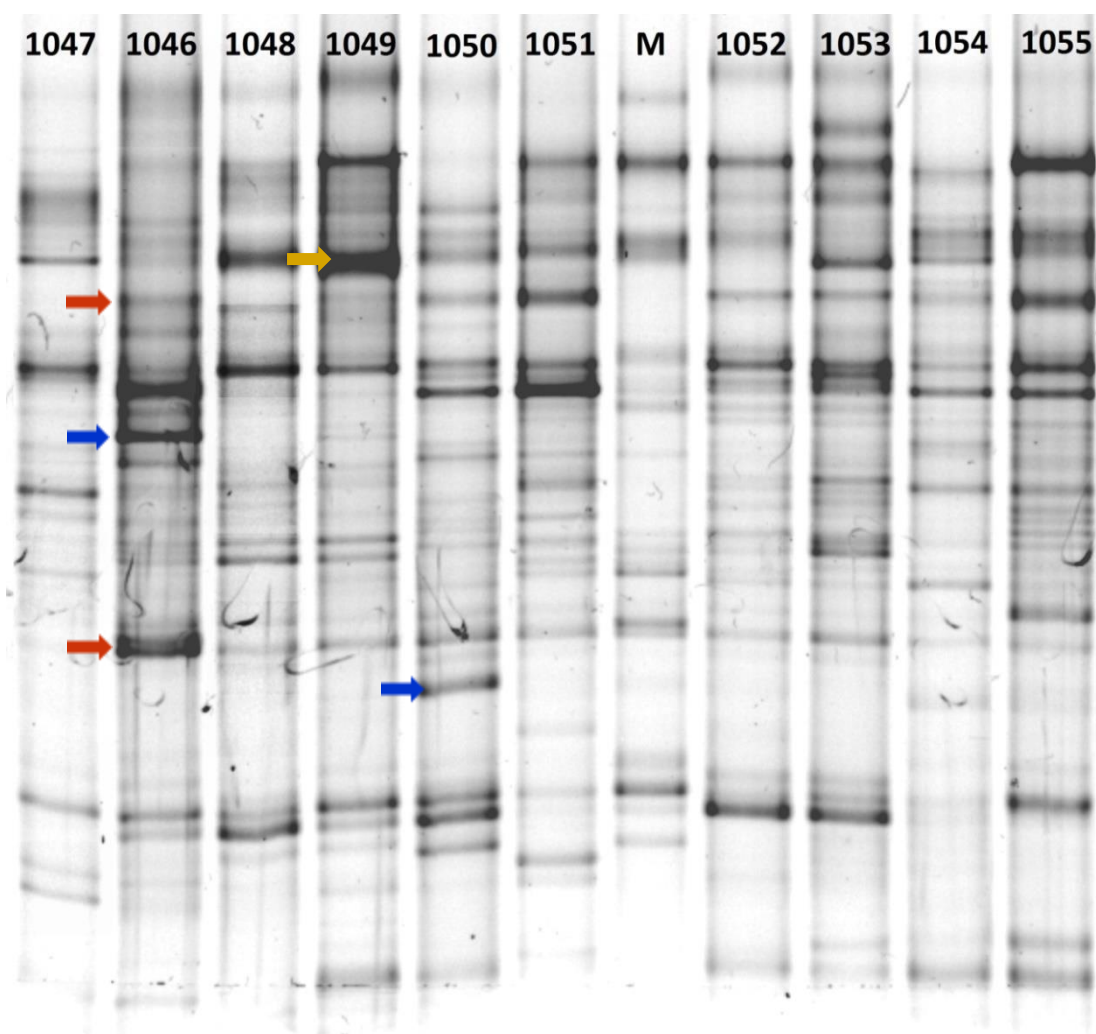


Figura 12. DGGE final con poliacrilamida al 8% y gradiente desnaturizante del 20% a 35% (ITS).

→ Banda con mayor intensidad. → Banda única. → Banda presente en todos los perfiles.

Se observa que existe gran número de comunidades en total, existiendo mínimas diferencias entre carriles, para éste caso existe una media de 20 bandas por carril, siendo el número 1053 que con 24 bandas, es la que mayor riqueza presenta y las muestras 1048, 1054 y 1055 con 17 bandas son las que menor riqueza poseen, la mayoría de bandas se repiten en los carriles, la muestra 1047 contiene cuatro bandas que no se repiten (banda N° 1, 3, 11, 18), la muestra 1046 con 23 bandas posee tres únicas (7, 18, 21), en el carril 1048 las bandas 6, 7, 17 y 17 son únicas para ésta muestra, mientras que en las muestras 1049 y 1052 no se hayan bandas irrepetibles, los carriles 1050 (21 bandas), 1051 (21 bandas) y 1054 poseen dos bandas únicas cada una

(bandas N° 17, 18; 16, 18 y 5, 7 respectivamente), a su vez los carriles 1053 y 1055 poseen una sola banda irrepetible (N° 3 y 17 respectivamente).

Referente a la intensidad en las bandas se aprecia (visualmente) variabilidad en éste factor, siendo las más intensas en el carril 1047 las bandas 7, 9 y 12, en el carril 1046 las bandas 9, 11 y 17, para el carril 1048 las bandas 5 y 8, en el carril 1049 las bandas 2 y 5; en el carril 1050 son las bandas 9, 19 y 20, en el carril 1051 las bandas 1, 5 y 7; para el carril 1052 son las bandas 3, 7 y 20, mientras que en el carril 1053 las más intensas son las bandas 2, 3, 9 y 24; en el carril 1054 existe una sola banda que resalta la 9 y finalmente para el carril 1055 las bandas 1, 4 y 5 presentan mayor intensidad frente a las demás, lo que indica que para éstas comunidades existen mayor número de individuos.

6.3. Índices de diversidad

Para caracterizar las comunidades microbianas presentes en suelos andinos rizosféricos se calcularon tres índices de diversidad: índice de Shannon - Weaver, índice de Riqueza y el índice de Equitatividad calculado a partir de los valores de los otros índices.

El análisis se realizó utilizando los geles correspondientes a las figuras 9 y 12, para la región 16S e ITS respectivamente. Aunque en las imágenes se observa gran cantidad de bandas, para los posteriores análisis solamente se utilizaron aquellas más intensas y definidas, para evitar la posible inclusión de artefactos en el análisis. En la Tabla 8 se presentan los valores obtenidos para cada uno de estos índices.

Tabla 8. Valores de los índices de diversidad obtenidos para la Región ADNr 16S.

Código de la Muestra	Manejo	Índice de Shannon - Weaver (H')	Índice de Riqueza	Índice de Equitatividad
*1047	Orgánico	2,767	18	0,957
*1046	Convencional	3,031	23	0,966
1048	Orgánico	2,747	17	0,969
1049	Convencional	2,785	20	0,929
1050	Orgánico	2,969	21	0,975
1051	Convencional	2,843	21	0,933
*1052	Orgánico	2,825	19	0,959
*1053	Convencional	3,122	24	0,982
1054	Orgánico	2,726	17	0,962
1055	Convencional	2,707	17	0,955

* Pares de muestras que tienen diferencias en los valores de los índices.

Los valores obtenidos luego de efectuarlos cálculos nos muestran muy poca variabilidad comparando tanto las muestras por pares y en general.

Se observa que para los pares número 1 (1047 - 1046) y número 4 (1052 - 1053), provenientes de la localidad de Principal, existe mayor diferencia en cuanto a índice de Shannon, siendo las muestras convencionales las que tendrían mayor diversidad de especies para éste caso, sin embargo todas las muestras presentan valores dentro del rango 2,5 a 3, siendo la escala de 1 a 5, podríamos deducir que éstas muestras tienen una diversidad media – alta.

Para el índice de riqueza se observa que las diferencias no son relevantes, comparando cada par de suelos y todas las muestras en general, el valor más alto es 24 proveniente de la muestra 1053 de suelos convencionales.

Finalmente para el índice de equitatividad se observa que todas las muestras están sobre 0,9, lo que significa que las diferentes especies son similares en cuanto a la abundancia por muestra de suelo, sin embargo comparando los resultados por pares se observa que en el número 2 (Sayausí: 1048 - 1049) y el número 3 (Sigsig: 1050 - 1051) existen mayores diferencias el uno frente al otro, siendo las muestras provenientes de suelos orgánicos con los valores más altos.

Tabla 9. Valores de los índices de diversidad obtenidos para la Región ADNr 16S.

Código de la Muestra	Manejo	Índice de Shannon - Weaver (H')	Índice de Riqueza	Índice de Equitatividad
*1047	Orgánico	2,394	12	0,963
*1046	Convencional	2,544	14	0,964
1048	Orgánico	2,386	12	0,960
1049	Convencional	2,529	14	0,958
1050	Orgánico	2,581	14	0,978
1051	Convencional	2,461	13	0,959
*1052	Orgánico	2,576	14	0,976
*1053	Convencional	2,516	14	0,953
1054	Orgánico	2,575	14	0,975
1055	Convencional	2,532	14	0,959

* Pares de muestras que tienen diferencias en los valores de los índices.

Los valores obtenidos luego de efectuar los cálculos al igual que en el anterior análisis, nos muestran muy poca variabilidad comparando tanto las muestras por pares y en general, siendo las diferencias para éste caso aún más estrechas.

Al igual que en el caso anterior, los pares número 1 (1047 - 1046) y número 4 (1052 - 1053) presentan mayor diferencia en cuanto a índice de Shannon, siendo las muestras convencionales las que tendrían mayor diversidad de especies para éste caso, sin embargo todas las muestras presentan valores dentro del rango 2,5 a 3, siendo la escala de 1 a 5, también se concluye que éstas muestras tienen una diversidad media – alta.

En el índice de riqueza se observa que las diferencias en cuanto a número de especies por muestra es muy baja pues va desde el rango 12 a 14, lo que significa que presentan mucha similitud en cuánto a riqueza, pues no se observan mayores diferencias comparando los pares de suelos.

Finalmente para el índice de equitatividad se observa que todas las muestras están sobre 0,9 lo que significa que las diferentes especies son similares en cuanto a la abundancia por muestra de suelo, sin embargo comparando los resultados por pares se observa que en el número 2 (1050 - 1051), el número 4 (1052 - 1053) y el número 5 (1054 - 1055) al igual que en primer análisis,

existen mayores diferencias el uno frente al otro, siendo las muestras provenientes de suelos orgánicos con los valores más altos.

6.4. Resultados del análisis físico y químico (pH, CE) de los suelos

Dentro de los objetivos se planteó determinar las características físico-químicas de los suelos, para tener mayor información sobre las muestras, adicionando también resultados de pH y conductividad eléctrica.

Para adicionar información a la presente investigación, se observó la correlación entre las características físicas de los suelos frente a los índices de diversidad se aplicó el coeficiente de correlación de: R de Pearson para las variables que presenten normalidad y Rho de Spearman entre variables al 95%, aplicando posteriormente un diagrama de dispersión para aquellas variables que resultaron altamente significativas (Anexos 9 y 10).

Tabla 10. Resumen de los resultados obtenidos del análisis físico y químico de las muestras de suelo.

Manejo	N° muestra	pH	C.E.	Densidad real	Densidad aparente	Porosidad	% Materia Orgánica	Arena %	Limo %	Arcilla %	Textura	% Contenido de humedad
Orgánico	1047	6,01	0,46	0,932	1,82	0,49	7%	54%	26%	21%	Franco	38%
Convencional	1046	6,72	0,61	0,819	1,67	0,51	16%	63%	31%	6%	Franco arenoso	29%
Orgánico	1048	6,23	0,33	0,994	1,82	0,45	8%	62%	26%	11%	Franco arenoso	29%
Convencional	1049	6,69	0,38	0,949	2,22	0,57	10%	62%	27%	11%	Franco arenoso	17%
Orgánico	1050	7	0,31	0,900	1,67	0,46	11%	52%	27%	21%	Franco	22%
Convencional	1051	6,47	0,17	0,873	2,00	0,56	8%	53%	35%	11%	Franco	32%
Orgánico	1052	6,22	0,21	1,061	2,22	0,52	9%	59%	30%	11%	Franco arenoso	32%
Convencional	1053	6,58	0,61	1,103	2,00	0,45	8%	58%	25%	16%	Franco arenoso	25%
Orgánico	1054	7,2	0,24	0,866	1,18	0,26	6%	64%	25%	11%	Franco arenoso	33%
Convencional	1055	6,86	0,2	0,980	1,82	0,46	8%	60%	24%	15%	Franco arenoso	30%

Como se observa en la Tabla 10, siendo suelos orgánicos las muestras: 1047, 1048, 1050, 1052 y 1054, frente a las convencionales, para las variables Densidad real, Densidad aparente y pH no existen diferencias significativas en las muestras, las variables % de humedad y Conductividad eléctrica son las que mayor variabilidad muestran en las figuras, mientras que en la “Materia orgánica” a pesar de haber variabilidad se mantienen dentro de los rangos normales para los suelos agrícolas.

6.5. Diferencias en las características de los suelos orgánicos frente a los convencionales

Como ya se mencionó, las pruebas a utilizar para las variables con normalidad es la prueba de T de student y para las variables con datos no normales es la prueba de U de Mann-Whitney.

La siguiente tabla muestra los valores obtenidos de las pruebas de significancia y también los datos de las medias y la desviación estándar.

En base a los anteriores resultados solamente a las variables: “% de porosidad”, % de Materia Orgánica e índice de Riqueza (Región 16S) se les aplicó la prueba de U de Mann-Whitney (Anexos 7 y 8).

Tabla 11. Valores obtenidos de las pruebas de significancia para las variables físicas y químicas.

Variable	Manejo	Media	Desviación Estándar	Test (valor p)
pH	Orgánico	6,532	0,53	0,617
	Convencional	6,664	0,147	
Conductividad eléctrica	Orgánico	0,31	0,097	0,455
	Convencional	0,394	0,212	
Densidad Real	Orgánico	0,95	0,077	0,925
	Convencional	0,944	0,108	
Densidad Aparente	Orgánico	1,74	0,374	0,335
	Convencional	1,942	0,207	
% de porosidad	Orgánico	44%	0,102	0,248*
	Convencional	51%	0,552	
% de Materia Orgánica	Orgánico	8%	0,019	0,389*
	Convencional	10%	0,034	

% de arena	Orgánico	58%	0,051	0,739
	Convencional	59%	0,039	
% de limo	Orgánico	27%	0,019	0,490
	Convencional	28%	0,045	
% de arcilla	Orgánico	15%	0,054	0,324
	Convencional	12%	0,039	
% Contenido de humedad	Orgánico	31%	0,059	0,334
	Convencional	27%	0,058	

* Resultado obtenido con la prueba U de Mann-Whitney, puesto que dicha variable no presentó normalidad.

Al resultar el *valor p* de cada variable mayor al valor de significancia (0,05), se concluye que no existen diferencias significativas en las variables físico – químicas de cada muestra de suelo en función de su manejo

Tabla 12. Valores obtenidos de las pruebas de significancia para los índices de diversidad.

Variable	Manejo	Media	Desviación Estándar	Test (<i>valor p</i>)
Índice de Shannon - Weaver (región 16S)	Orgánico	2,502	0,102	0,783
	Convencional	2,516	0,032	
Índice de Riqueza (región 16S)	Orgánico	13,2	1,095	0,366*
	Convencional	13,8	0,447	
Índice de Equitatividad (región 16S)	Orgánico	0,971	0,008	0,029
	Convencional	0,959	0,003	
Índice de Shannon - Weaver (región ITS)	Orgánico	2,807	0,097	0,344
	Convencional	2,898	0,173	
Índice de Riqueza (región ITS)	Orgánico	18,4	1,673	0,115
	Convencional	21	2,739	
Índice de Equitatividad (región ITS)	Orgánico	0,964	0,007	0,340
	Convencional	0,953	0,022	

* Resultado obtenido con la prueba U de Mann-Whitney, puesto que dicha variable no presentó normalidad.

En base al resultado del *valor p* para los índices de diversidad, la variable Índice de Equitatividad (región 16S) presenta un valor de significancia menor, por lo que estadísticamente dicho índice es mayor en suelos orgánicos que en convencionales.

Para las demás variables no existen diferencias significativas en los índices de diversidad en función de su manejo.

6.6. Comparación de las estructuras de las comunidades de bacterias y hongos de los suelos

La técnica DGGE generó perfiles ligeramente diferentes para cada muestra de suelo, observando el número de bandas se determinó la riqueza en cada suelo, sin embargo a pesar de tener la banda en la misma posición, se observa que la intensidad de la misma es diferente, lo que indica variabilidad en la diversidad de las comunidades bacterianas en éstas muestras.

Una vez realizado el análisis jerárquico utilizando los algoritmos UPGMA, *Neighbour Joining*, *Single Linkage*, *Complete Linkage* y WPGMA, se obtuvieron siguientes resultados:

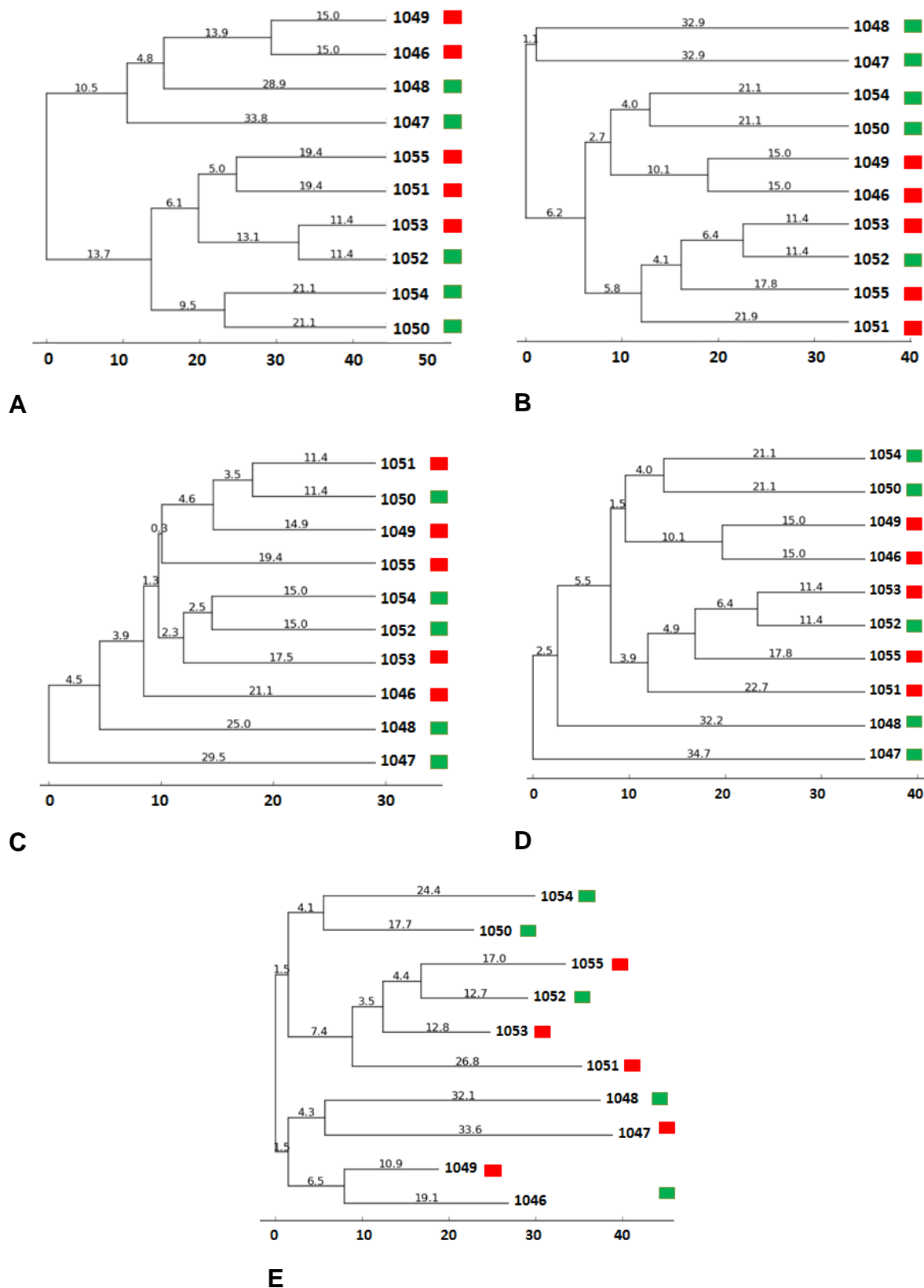


Figura 13. Agrupamientos jerárquicos aplicados a la región ITS. *Complete Linkage* (A), *WPGMA* (B), *Simple Linkage* (C), *UPGMA* (D), *Neighbour Joining*, (E).

■ Manejo convencional. ■ Manejo orgánico

En el Análisis de agrupamiento jerárquico utilizando los distintos algoritmos de perfiles de DGGE de fragmentos amplificados de la región ITS de hongos a partir de ADN metagenómico, los perfiles que más similitudes presentan son el par número 4: 1052 y 1053, provenientes de la localidad de Principal (Chordelég), se observa que las muestras 1054 (Paute) y 1050 (Sigsig) también presentan similitudes en cuanto a su estructura, lo mismo sucede con las muestras 1049 (Sayausí) y 1046 (Principal), siendo sus pares las muestras 1048 y 1047 respectivamente las que presentan perfiles más distintos al resto, siendo ambas de origen orgánico, sin embargo los conglomerados al final agrupan a las muestras de manera homogénea, por lo que se podría considerar que para éstas muestras no existen diferencias, puesto que no se dan agrupamientos consistentes, resultado que se repite en el análisis de la Región ADNr 16S.

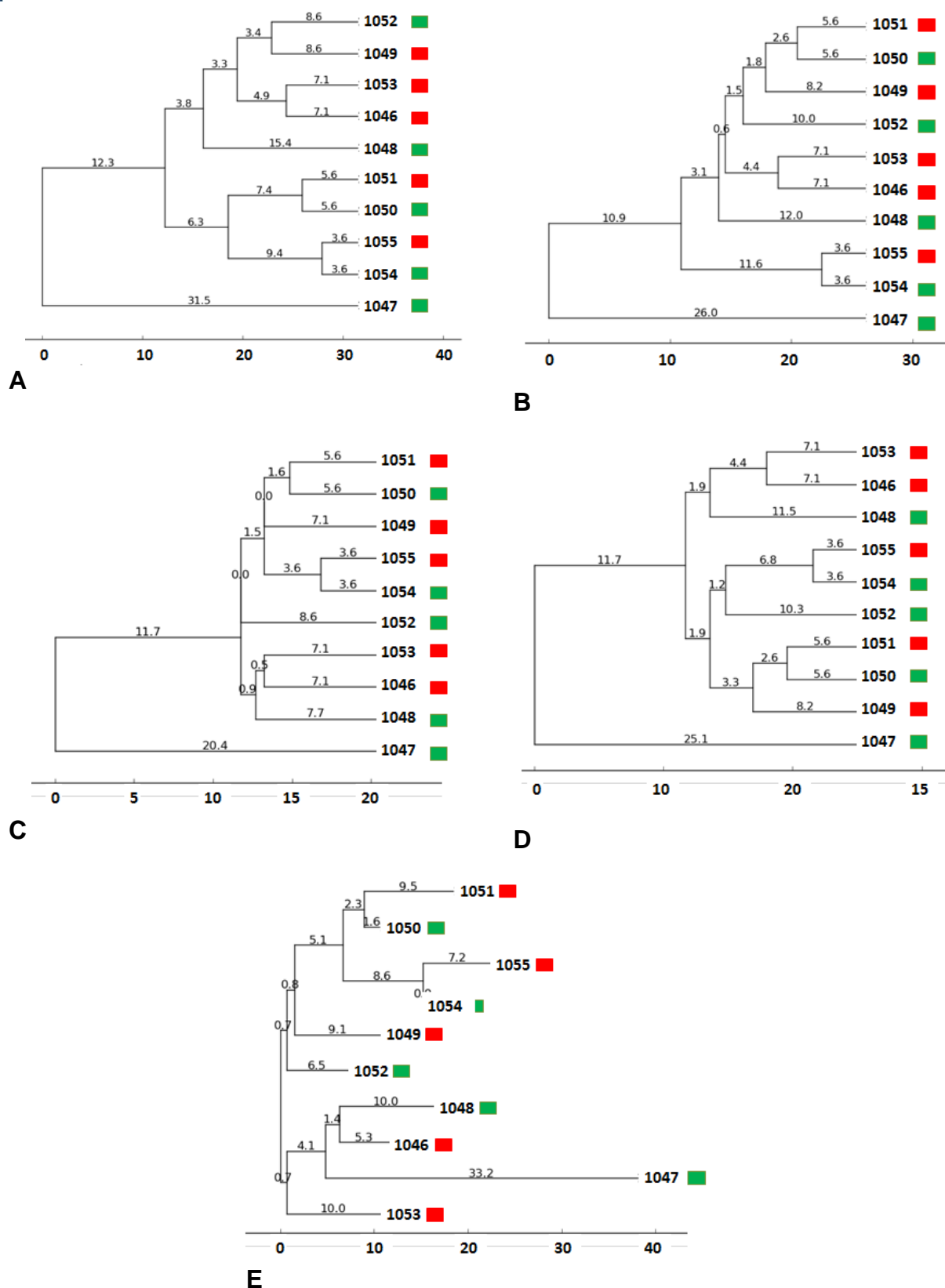


Figura 14. Agrupamientos jerárquicos aplicados a la región ADNr 16S. *Complete Linkage* (A), *WPGMA* (B), *Simple Linkage* (C), *UPGMA* (D), *Neighbour Joining*, (E).

■ Manejo convencional. ■ Manejo orgánico



Para éste caso, las observaciones que más similitudes presentan son el par 1054 y 1055 provenientes de Paute considerando el hecho que para la región ITS éste par no se relacionó en absoluto, así también en las muestras 1053 y 1046 (Principal), también se observa que la muestra de origen orgánico 1047 (Principal) difiere considerablemente de las demás al igual que en el análisis de la región ITS, finalmente no existe una tendencia clara para los agrupamientos, puesto que los conglomerados al final agrupan a las muestras de manera homogénea, sin distinción del manejo, por lo que se podría considerar de igual manera que el anterior caso, que en éstas muestras no existen diferencias relevantes, ya que no se dan agrupamientos consistentes.

7. DISCUSIÓN

En la presente investigación se evaluó las posibles diferencias entre las comunidades microbianas de hongos y bacterias presentes en suelos manejados bajos los sistemas orgánico y convencional cultivados con frutales, a través del uso de la técnica de DGGE, sin embargo los resultados obtenidos no nos permiten dar dicha conclusión. Además se evaluaron los parámetros óptimos para aplicar dicha técnica en las muestras de suelo, obteniendo resultados positivos.

La técnica PCR utilizada dio resultados positivos al amplificar las regiones deseadas. Wu et al. (2013) utilizó los cebadores ITS1Fc e ITS2 para amplificar la región ITS1 para estimar la biogeografía de las comunidades fúngicas en sedimentos de los ríos. Así también Liu et al. (2015) reportó, comparando varios cebadores que ITS1 e ITS4 revelan mucha más riqueza y diversidad en comunidades fúngicas para suelos y agua. Dando cabida a utilizar dichos cebadores para ésta investigación, ya que se obtuvieron perfiles claramente identificables de las comunidades fúngicas presentes en los suelos. Brons y van Elsas (2008) compararon varios cebadores para analizar comunidades bacterianas en suelos con la técnica DGGE, determinando que el cebador 1401R1a dio resultados altos en cuanto a la diversidad de comunidades bacterianas en suelos. Se decidió utilizar dicho cebador para ésta investigación.

Respecto a las condiciones de DGGE para la región ITS se utilizó poliacrilamida en una concentración del 8%, con un gradiente desnaturizante del 20% al 35%. Wu et al. (2013) utilizando un gradiente desnaturizante de 30 - 50% en un gel de poliacrilamida al 8%, logró detectar distintas OTU's en comunidades fúngicas. Sin embargo menciona que existió heterogeneidad entre muestras respecto a las bandas obtenidas, siendo más eficiente para su investigación los métodos tradicionales en cultivos de hongos. Brons y van Elsas (2008) utilizaron poliacrilamida al 6% y un gradiente desnaturizante del 40 a 70% para comunidades bacterianas, obtuvieron resultados positivos, pues lograron tener patrones reproducibles con los cebadores que ellos utilizaron. En

ésta investigación se probó dichos parámetros, pero la imagen resultante no permitía hacer los respectivos análisis, siendo necesario los ensayos explicados en la parte de resultados. (Figura. 6 a Figura. 9).

Buckley y Schmidt (2003) mencionan que las prácticas agronómicas, tales como la rotación de cultivos, aplicación de abonos, arado, aplicación de pesticidas e incluso los organismos genéticamente modificados tienen un efecto sobre las comunidades microbianas del suelo. Shannon et al. (2002) mencionan que la aplicación de insumos orgánicos reportan el incremento en la diversidad de microorganismos sobre todo en grupos como *Pseudomonas* y *Actinomycetes*, favoreciendo en su estructura frente a suelos convencionales. Neufeld y Mohn (2005) encontraron que en suelos no arados existió mayor diversidad que en suelos que si realizaban esta práctica, dando una correlación negativa con la porosidad, debido al efecto de la compactación. Estas evidencias demuestran que un manejo orgánico tiende a favorecer en la diversidad y estructura a las comunidades bacterianas y fúngicas en el suelo. Sin embargo aún no existe información certera sobre los factores que puedan o no estructurar y/o alterar su diversidad, Garbeva et al. (2003) mencionan que para tener un mayor entendimiento sobre los microorganismos en los suelos es necesario un enfoque más amplio, realizando los estudios caso por caso debido a la complejidad de los sistemas.

Muyzer (1993) menciona que el uso de DGGE permite analizar distintas muestras de manera simultánea y que es capaz de proporcionar de manera sencilla la composición de las poblaciones microbianas en distintos medios, además del análisis de la dinámica de las comunidades en respuesta a factores ambientales. Para ésta investigación, los perfiles dados por la técnica permitieron realizar los análisis de diversidad, observando claramente el número y la intensidad de las bandas como referencia. Técnica que se ha aplicado en varias investigaciones con el objetivo de determinar la diversidad de las comunidades microbianas tanto de bacterias, (Peixoto et al. 2002; Agnelli et al. 2004; Gonzalez Perez et al. 2014) entre otros, como para comunidades fúngicas (Vallejo et al. 2010; Landazábal 2013).

El presente estudio determinó que no existen diferencias relevantes en los índices de diversidad de suelos orgánicos frente a suelos convencionales, lo que indicaría que existen factores externos que puedan determinar la diversidad, Diepeninggen (2006) mencionan que éstos factores podrían estar relacionados con el tipo de suelo, por el tipo de cultivo, el uso de cultivos de cobertura y el historial de manejo de la granja. Araujo (2009) determinó que en suelos orgánicos existe mayor actividad microbiana medida por la respiración del suelo y carbono orgánico, debido a la inclusión de altas cantidades de materia orgánica para dicho manejo. Diepeningen et al. (2006) encontraron una mayor diversidad biológica en eubacterias y así también mayor actividad biológica. Marinari (2006) también evidenciaron que el manejo orgánico aumenta la biomasa microbiana, mejorando la calidad del suelo, además encontraron que la Conductividad eléctrica tenía variabilidad en los suelos con diferente manejo, por su parte Peixoto et al. (2002) utilizando la técnica DGGE observó pequeñas diferencias en las estructuras de las comunidades bacterianas que han sido sometidas a diferentes manejos, resultado que reporta también Piao et al. (2008) al observar que los patrones de DGGE en la región V3 obtuvieron mínimas diferencias con respecto a la posición de las bandas.

Vallejo (2010) estudiando la biodiversidad edáfica como indicador de la salud del suelo con la técnica DGGE concluyó que los valores asociados a la diversidad y abundancia de las comunidades microbianas en suelos con manejo convencional son menores que en suelos con manejo orgánico. Puesto que la aplicación continua de biofertilizantes orgánicos tiende a aumentar significativamente la abundancia microbiana y en base a la información colectada en cada finca, aquellas convencionales realizaban aplicaban materia orgánica, aunque en menor medida que su contraparte. Sin embargo también observó que durante los tres primeros años de transición éstos valores no presentaban diferencias significativas. Siendo éste último un factor importante a tomar en cuenta, puesto que todos los suelos orgánicos muestreados para la presente investigación venían de un proceso de transición del manejo convencional de alrededor de 8 años.

Muyzer (1993) menciona que el uso de la técnica está limitada a los miembros dominantes de las comunidades microbianas, las cuales deben representar como mínimo el 1% de la población microbiana total que dé como resultado una banda visible en un gel de DGGE.

Comparando las estructuras de las comunidades, no se encontraron diferencias relevantes. Tomando en cuenta que para éste análisis se tomaron en cuenta el número y la posición de las bandas, los cuales no muestran la totalidad real de las comunidades presentes (Bajsa 2008). Piao et al. (2008) utilizando ADNr 16S para determinar las estructuras de las comunidades actinobacterianas en suelos con manejo orgánico y convencional de igual manera encontraron que los patrones fueron similares para los tratamientos, encontrando diferencias en la intensidad de las bandas. Resultado que coincide con ésta investigación, aunque Landazábal (2013) determinó diferencias significativas evaluando las comunidades bacterianas y fúngicas en suelos arroceros aplicando a su investigación un número considerable de muestras. Lo que indicaría que para obtener datos más certeros es necesario evaluar un número de pares mayor. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que en la provincia del Azuay no existen agentes reguladores de fincas orgánicas, siendo esto un gran problema al momento de detectar granjas con dicho manejo para una investigación.

Relacionando los resultados de los análisis físico-químicos de los suelos con los índices de diversidad dieron como resultado que no existe correlación alguna las unas variables con las otras. Neufeld y Mohn (2005) comparando suelos de Norte América encontraron diferencias significativas y una mayor diversidad en comunidades bacterianas en suelos que no han sido perturbados. Observando los resultados sobre la textura de los suelos muestreados, todos tienen un porcentaje considerable de arena, lo que validaría la información recatada por Gelsomino et al. (1999) que aplicando la técnica de DGGE encontraron diferencias altamente significativas en las estructuras de comunidades bacterianas frente a los tipos de suelo, concluyendo que similares tipos de suelo, tienden a tener similares estructuras



bacterianas predominantes. Garbeva et al. (2003) en su investigación proponen que sean considerados de igual manera los factores “tipo de suelo” y “tipo de planta”, ya que en su investigación encontraron que en algunas situaciones es el suelo y en otros el tipo de planta el factor determinante que afecta a la comunidad microbiana.

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

8.1. Conclusiones

Los valores obtenidos en la caracterización física de los suelos, además de los valores de pH y conductividad eléctrica no presentaron diferencias en cuanto al manejo de las granjas.

Los índices de riqueza y diversidad determinados para cada una de las muestras determinaron que no se dieron diferencias significativas en cuanto al manejo orgánico y convencional, esto podría deberse al proceso de transición de las fincas orgánicas y/o al porcentaje de arena similar que presentaron en el análisis de textura todas las muestras.

La optimización de la gradiente desnaturalizante y los parámetros de corrida electroforética de la técnica de DGGE tanto para las comunidades bacterianas como fúngicas, concluyó con resultados positivos, pudiendo observar claramente la posición e intensidad de las bandas, siendo de gran utilidad contar con ésta base para futuros experimentos, dentro de la misma línea de investigación.

En ésta investigación al comparar los parámetros de las comunidades microbianas que colonizan suelos frutales andinos bajo los dos sistemas, no se encontraron diferencias significativas en las variables analizadas a excepción del Equitatividad (región ADN_r 16S) que en base a las pruebas de significancia resultó estadísticamente mayor en suelos orgánicos que en convencionales, pero biológicamente ésta diferencia como tal no tendría relevancia, sin embargo en base a la bibliografía consultada el tipo de suelo resultaría el principal factor determinante de la estructura y diversidad de las comunidades microbianas.

8.2. Recomendaciones

Considerar un mayor número de muestras a analizar para obtener resultados más representativos de la zona en estudio.

Identificar las Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) más comunes entre los perfiles de los suelos.

9. REREFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Agnelli, A; Ascher, J; Corti, G; Teresa, M; Nannipieri, P; Pietramellara, G. 2004. Distribution of microbial communities in a forest soil profile investigated by microbial biomass, soil respiration and DGGE of total and extracellular DNA. *Soil Biology and Biochemistry* 36: 859-868.

Anderson, IC; Cairney, J. 2004. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology* 6: 769-779.

Araujo, A; Leite, L; Santos, V; Carneiro, R. 2009. Soil microbial activity in conventional and organic agricultural systems. *Sustainability* 10: 268-276.

Bajsa, N. 2008. Efecto del pastoreo bovino sobre la comunidad bacteriana en un suelo de pradera natural. s.l., Universidad de la República. 50-53 p.

Barrer, SE. 2009. El Uso De Hongos Micorrizicos Arbusculares Como Una Alternativa Para La Agricultura. *Facultad de ciencias Agropecuarias* 7(1): 124-132.

Barrios, E. 2007. Soil biota, ecosystem services and land productivity. *Ecological Economics* 4(64): 269 - 285.

Bernal, G. 2006. La microbiología de suelos en el Ecuador: Situación actual de la investigación. *In Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo* (10, 2006, Quito, Ecuador).

Blake, G; Hartge, K. 1986. Bulk density. *Methods of soil analysis. Physical and mineralogical methods*. 2 ed. s.l., s.e., p.363 - 375.

Bouyoucos, GJ. 1961. Hydrometer Method Improved for Making Particle Size Analyses of Soils. *ACSESS* 54: 464 - 465.

Brons, JK; van Elsas, JD. 2008. Analysis of Bacterial Communities in Soil by Use of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Clone Libraries, as Influenced by Different Reverse Primers □. *Applied and Environmental Microbiology* 74(9): 2717-2727.

Van Bruggen, AHC; Semenov, AM. 2000. In search of biological indicators for soil health and disease suppression. *Applied Soil Ecology* 15: 13-24.

Buckley, DH; Schmidt, TM. 2003. Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. *Environmental Microbiology* 5(6): 441-452.

Calvo García, S. 2011. Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. *Ct* 3: 173-186.

Classen, AT; Boyle, SI; Haskins, KE; Overby, ST; Hart, SC. 2003. Community-level physiological profiles of bacteria and fungi: Plate type and incubation temperature influences on contrasting soils. *FEMS Microbiology Ecology* 44(3): 319-328.



Díaz Ruiz, G; Wachter Rodarte, C. 2003. Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 45(1-2): 30-40.

Diepeningen, AD Van; Vos, OJ De; Korthals, GW; Bruggen, AHC Van. 2006. Effects of organic versus conventional management on chemical and biological parameters in agricultural soils. *ELSEVIER* 31: 120-135.

Drinkwater, L; Letourneau, D; Workneh, F; van Bruggen, H; Shennan, C. 2014. Fundamental Differences Between Conventional and Organic Tomato Agroecosystems in California FUNDAMENTAL DIFFERENCES BETWEEN CONVENTIONAL AND ORGANIC TOMATO AGROECOSYSTEMS IN CALIFORNIA '. *Ecological Society of America* 5(4): 1098-1112.

Duarte, S; Cássio, F; Pascoal, C. 2012. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) in Microbial Ecology – Insights from Freshwaters. *InTech Europe* 2012: 173 - 196.

Ercolini, D. 2004. PCR-DGGE fingerprinting : novel strategies for detection of microbes in food. 56: 297-314.

Flórez, N; García, JC; Del Portillo, P; Restrepo, S; Uribe, D. 2013. Composition and function of the microbial community related with the nitrogen cycling on the potato rhizosphere. *Universidad Nacional de Colombia* 18(3): 449-464.

Forsythe, W. 1985. Física de los suelos. San José, s.e., 212.

Galeano, CH. 2012. Estandarización de la técnica molecular de AFLP en palma de aceite tipo dura (*elaeis guineensis jacq.*) y estudio preliminar de caracterización. *Agronomía Colombiana* 23(1): 42-49.

Garbeva, P; Veen, JA Van; Elsas, JD Van. 2003. Predominant *Bacillus* spp . in Agricultural Soil under Different Management Regimes Detected via PCR-DGGE. *Microbiological Ecology* 45: 302-316.

Gelsomino, A; Keijzer-wolters, AC; Cacco, G; Elsas, JD Van. 1999. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis . 38: 1-15.

Gonzalez Perez, P; Ye, J; Wang, S; Wang, X; Huang, D. 2014. Analysis of the occurrence and activity of diazotrophic communities in organic and conventional horticultural soils. *Applied Soil Ecology* 79(January 2016): 37-48.

Guirao, P; Beitia, F; Cenis, JL. 1994. Aplicación de la técnica RAPD-PCR a la taxonomía de moscas blancas (Homoptera, Aleyrodidae). *Boletín de Sanidad Vegetal* 20: 757-764.

Hernández, A; Bautista, S; Velázquez, M; Hernández, A. 2007. Uso de Microorganismos Antagonistas en el Control de Enfermedades Postcosecha en Frutos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25(1): 66-74.

Hoshino, YT. 2011. Molecular Analyses of Soil Fungal Community – Methods and Applications. National Institute for Agro-Environment Sciences 2011.

Janse, I; Bok, J; Zwart, G. 2004. A simple remedy against artifactual double bands in denaturing gradient gel electrophoresis. 57: 279-281.

Kanagawa, T. 2003. Bias and Artifacts in Multitemplate Polymerase Chain Reactions (PCR). Journal of Bioscience and Bioengineering 96(4).

Korbie, DJ; Mattick, JS. 2008. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. 2008: 13-15.

Kozdrój, J; van Elsas, JD. 2000. Application of polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis for comparison of direct and indirect extraction methods of soil DNA used for microbial community fingerprinting. Biology and Fertility of Soils 31(5): 372-378.

Landazábal, GA. 2013. Comparación de la estructura y diversidad de las comunidades de bacterias y hongos rizosféricos de cuatro zonas arroceras de los departamentos Tolima y Meta. s.l., Universidad Nacional de Colombia. 41-46 p.

Liu, J; Yu, Y; Cai, Z; Bartlam, M; Wang, Y. 2015. Comparison of ITS and 18S rDNA for estimating fungal diversity using PCR – DGGE. World Journal of Microbiology and Biotechnology 31(9): 1387-1395.

Lovera, M; Cuenca, G. 2007. Diversidad de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y potencial micorrízico del suelo de una Sabana natural y una Sabana perturbada de La Gran Sabana, Venezuela. Interciencia 32(2): 108-114.

Marinari, S; Mancinelli, R; Campiglia, E; Grego, S. 2006. Chemical and biological indicators of soil quality in organic and conventional farming systems in Central Italy. Ecological Indicators 6: 701-711.

Michel, A; Sanches, M; Martinez, R; Rodriguez, N; Ariza, R; Barrios, A. 2008. Producción masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai en diferentes sustratos orgánicos. Chapingo Serie horticultura 14(2): 185-191.

Moeskops, B; Sukristiyonubowo; Herawaty, L; Anggria, L; Husen, E; Saraswati, R; Buchan, D; De Neve, S. 2005. Effect of organic and conventional farming on soil microbiological and dynamics. 2005: 2-3.

Muyzer, G; de Waal, EC; Uitterlinden, a G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology 59(3): 695-700.

Myers, R; Maniatis, T; L, L. 1987. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel - electrophoresis. Methods in Enzymology 1987: 501 - 527.

Nannipieri, P; Ascher, J; Cecceherini, T; Landi, L; Pietramellara, G; Renella, G. 2003. Microbial diversity and soil functions. European Journal of Soil Science no.December: 655-670.



Neilson, JW; Jordan, FL; Maier, RM. 2013. Analysis of artifacts suggests DGGE should not be used for quantitative diversity analysis. *Journal of Microbiological Methods* 92(3): 256-263.

Neufeld, JD; Mohn, WW. 2005. Unexpectedly High Bacterial Diversity in Arctic Tundra Relative to Boreal Forest Soils, Revealed by Serial Analysis of Ribosomal Sequence Tags. *Applied and Environmental Microbiology* 71(10): 5710-5718.

Nocker, A; Burr, M; Camper, AK. 2007. *Microbial Ecology*. 54: 276-289.

Nogales, B. 2005. La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. *Ecosistemas* 2(2): 1-10.

Paucar, B; Díaz, N; Alvarado, S. 2011. Efecto del manejo de suelo sobre las poblaciones microbianas en suelos de la Sierra de Ecuador. 2011.

Peixoto, RS; Coutinho, HLC; Rumjanek, NG; Macrae, A; Rosado, AS. 2002. Use of rpo B and 16S rRNA genes to analyse bacterial diversity of a tropical soil using PCR and DGGE. no.2000: 316-320.

Piao, Z; Yang, L; Zhao, L; Yin, S. 2008. Actinobacterial Community Structure in Soils Receiving Long-Term Organic and Inorganic Amendments. *Applied and Environmental Microbiology* 74(2): 526-530.

Prosser, JI. 2002. Molecular and functional diversity in soil micro-organisms. *Plant and Soil* 244(1-2): 9-17.

Roesch, LFW; Fulthorpe, RR; Riva, A; Casella, G; Km, A; Kent, AD; Daroub, SH; Camargo, FAO; Farmerie, WG; Triplett, EW. 2007. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *The ISME Journal* 000: 283-290.

Sánchez, L; del Blanco, M. 1995. Caracterización de las fracciones limo y arcilla en suelos loésicos del suroeste pampeano en Argentina. *Turrialba* 45(2): 77-84.

Santa María, C; Soria, M; Varela, F. 2011. Aplicaciones de data mining al estudio de la biodiversidad. s.l., Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires.

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis in Marine Microbial Ecology (30, 2001, Bremen). 2001. Ed. Schafer, H; Muyzer, G. Bremen, v.30.

Schumacher, B. 2002. Methods for determination of total organic carbon (TOC) in soils and sediments. s.l.,

Shannon, D; Sen, AM; Johnson, DB. 2002. A comparative study of the microbiology of soils managed under organic and conventional regimes. *Soil Use and Management* 18: 274-283.

Tabacchioni, S; Chiarini, L; Bevivino, a; Cantale, C; Dalmastrì, C. 2000. Bias caused by using different isolation media for assessing the genetic diversity of a natural microbial population. *Microbial Ecology* 40(3): 169-176.



Thompson, JR; Marcelino, LA; Polz, MF. 2002. Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by 'reconditioning PCR'. Oxford Journals 30(9): 2083-2088.

Torsvik, V; Øvreås, L. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. Department of Microbiology of University of Bergen 2002: 240-245.

Traina, MMWSJ; Peters, BRSE. 1994. Organic and Conventional Management Effects on Biologically Active. 1994: 1130-1139.

Vallejo, V; Mijangos, I; Garbisu, C. 2010. Biodiversidad edáfica como bioindicador de la salud del suelo mediante métodos moleculares. s.l., Universidad del País Vasco. 15 p.

Vargas, Y. 2010. Establecimiento de frutales amazónicos bajo sistemas agroforestales. INIAP - FRUTICULTURA 2010.

Vilatu, JE; Sandoval, DP; Tigrero, LJO. 2010. Manejo y control de moscas de la fruta. Quito, AGROCALIDAD, 1-3.

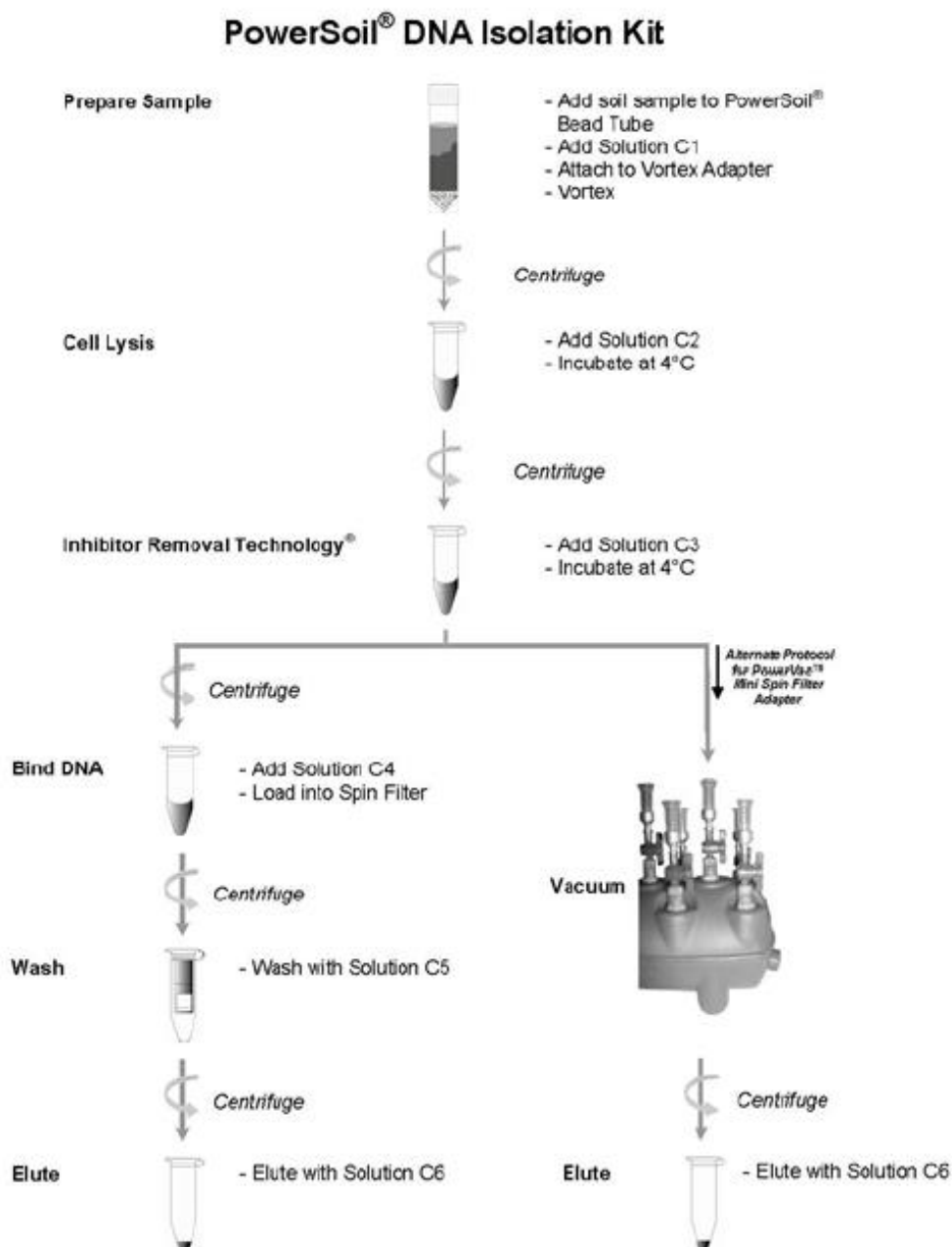
Whitman, WB; Coleman, DC; Wiebe, WJ. 1998. Prokaryotes: The unseen majority. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(June): 6578-6583.

Wu, B; Tian, J; Bai, C; Xiang, M; Sun, J; Liu, X. 2013. The biogeography of fungal communities in wetland sediments along the Changjiang River and other sites in China. The ISME Journal 7(7): 1299-1309.

Zelles, L. 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterization of microbial communities in soil: A review. Biology and Fertility of Soils no.29: 111-129.

10. ANEXOS

Anexo 1. Diagrama de flujo sobre la extracción de ADN aplicando el kit Power Soil Isolation.



Fuente: MO BIO Laboratories, Inc.

Anexo 2. Equipamiento utilizado en laboratorio para PCR y DGGE.



a. Conjunto de equipos utilizados en la aplicación de DGGE.



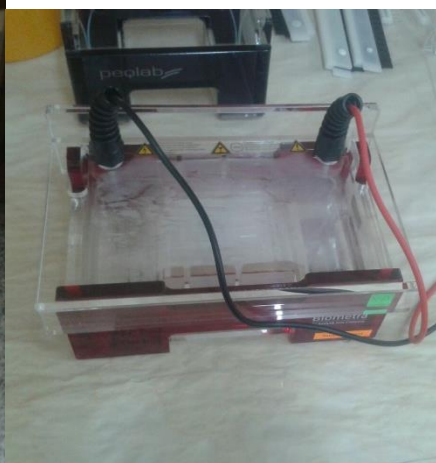
b. Conjunto de reactivos utilizados.



c. Cámara para PCR.



d. Termociclador



e. Electroforesis en gel de agarosa del producto PCR.



f. Conjunto de equipos utilizados para la extracción del ADN de suelo.



e. Equipo utilizado para revelar las imágenes obtenidas de los perfiles de DGGE.

Anexo 3. Parte de los huertos frutales de los que se tomaron las muestras.



a. Parte de huerto frutal típico en la zona de Principal.



b. Huerto frutal en el cantón Sigüig.



Huerto frutal en la zona de Sayausí.

Anexo 4. Componentes de Platinum PCR SuperMix.

Componentes	Volúmen
Complexed recombinant <i>Taq</i> DNA polymerase with Platinum	22 U/mL
Tris – HCl (pH 8,4)	22 mM
KCl	55 mM
MgCl ₂	1,65 mM
dGTP	220 µM
dATP	220 µM
dTTP	220 µM
dCTP	220 µM

Anexo 5. Ficha descriptiva de la zona aplicada a cada sitio de muestreo.

Descripción del sitio											
Código de muestreo:											
Pendiente (estimar el % de pendiente y orientación):											
Plano	Ligera	Moderada	Fuerte								
Homogeneidad del suelo:											
Heterogéneo	1	2	3	4	5	Homogéneo					
Propenso a inundación: Si No											
Estacionalidad de las precipitaciones (marcar los meses de lluvia):											
E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Nivel de humedad en el suelo en el momento del muestreo											
Anegado	Muy húmedo	Húmedo	Parcialmente seco	Muy seco							

Anexo 6. Encuesta de manejo e historial del sitio aplicada para cada muestra.**Encuesta de manejo e historia del sitio**

Código de muestreo:

Fecha de muestreo:

Nombre del encargado:

Nombre del predio (si tuviera):

Tipo de sistema de producción: **ORGÁNICO** **CONVENCIONAL**

Cultivo:

Edad del cultivo en la parcela donde se va a muestrear:

Cobertura al momento del muestreo (seleccione el que corresponda):

- Suelo sin cobertura
- Pocas malezas
- Muchas malezas
- Cultivo de cobertura o asociado (indique cuál: _____)
- Otra (especifique: _____)

Aportes al suelo (seleccione todos los que apliquen):

- Fertilizantes sintéticos:
 - Tipo:
 - Frecuencia de aplicación:
 - Cantidades aplicadas:
- Materia orgánica:
 - Tipo:
 - Frecuencia de aplicación:
 - Cantidades aplicadas:
- Pesticidas:
 - Tipo:
 - Frecuencia de aplicación:
 - Cantidades aplicadas:

Laboreo del suelo aplicado en los últimos 5 años (seleccione los que apliquen):

- Labranza mecanizada
 - Profundidad
 - Frecuencia
- Labranza con tracción animal
 - Profundidad
 - Frecuencia
- Labranza manual
 - Profundidad
 - Frecuencia
- No hace labranza

Riego y drenaje

- No riega (cultivo de secano)
- Riego por surcos
- Riego por inundación
- Riego por aspersión
- Riego por goteo

Aportes al cultivo

- Principales insumos que aplica usted a la parte aérea del cultivo (seleccione todos los que apliquen indicando el nombre de los productos usados)
 - Insecticidas sintéticos:
 - Fungicidas sintéticos:
 - Estimulantes/hormonas sintéticos:
 - Insecticidas orgánicos:
 - Bioles:
 - Té de estiércol/té de frutas:
 - Elementos químicos (ej. Azufre, polvo de rocas)
 - Otros:

Uso previo

- ¿Cuánto tiempo ha estado esta parcela bajo producción agrícola continua?
- ¿Qué uso tenía este suelo antes de su cultivo actual?
- Si practica rotación de cultivos, describa por favor una rotación típica para esta parcela

Historia de patógenos y problemas fitosanitarios

- ¿Qué problemas con microorganismos patógenos o insectos plaga del suelo ha tenido en esta parcela?

Valoración subjetiva de la calidad del suelo

- ¿Como considera usted la calidad de su suelo?
Pésima Mala Regular Buena Muy buena Excelente
- ¿Qué prácticas ejecuta para mantener o mejorar la calidad de su suelo?

Anexo 7. Normalidad de las variables.

La normalidad de los datos se verificó entorno al manejo (5 muestras orgánicas y 5 convencionales) a través del Test de Shapiro – Wilk debido a las pocas muestras a analizar, tomando cada una de las variables tanto del análisis físico como de los índices de diversidad. Planteándonos la Hipótesis nula (H_0): Los valores de cada variable tienen una distribución normal. Se comparó con el valor p con el nivel de confianza de 95% (0,05), dieron los resultados especificados en las siguientes tablas.

Pruebas de normalidad de las variables físicas y químicas de los suelos.

Variable	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
pH	0,9794	10	0,9621
Conductividad eléctrica	0,8894	10	0,1671
Densidad Real	0,9715	10	0,9042
Densidad Aparente	0,9079	10	0,2666
% de porosidad	0,8265	10	0,0303*
% de Materia Orgánica	0,8156	10	0,0224*
% de arena	0,9069	10	0,2604
% de limo	0,8680	10	0,0947
% de arcilla	0,8691	10	0,0977
% Contenido de humedad	0,9519	10	0,6911

Se observa que el valor de significancia (valor p) en la mayoría de las variables es mayor a 0,05, por lo que no rechazamos la Hipótesis nula y concluimos que los datos siguen una distribución normal a excepción de las variables “% de porosidad” que con un valor de significancia de 0,0303 y la variable “% de Materia Orgánica” que con un valor de 0,0224 son menores al nivel de confianza (0,05) para éstos dos casos rechazamos la hipótesis nula y concluimos que los datos no se distribuyen normalmente para ésta variable.

Anexo 8. Pruebas de normalidad para índices de diversidad en las muestras de suelo.

Variable	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Índice de Shannon - Weaver (región 16S)	0,8507	10	0,0592
Índice de Riqueza (región 16S)	0,6276	10	0,0001*
Índice de Equitatividad (región 16S)	0,8636	10	0,0841
Índice de Shannon - Weaver (región ITS)	0,8798	10	0,1296
Índice de Riqueza (región ITS)	0,9061	10	0,2553
Índice de Equitatividad (región ITS)	0,9269	10	0,4182

En los índices de diversidad también se repite la tendencia de la normalidad en la mayoría de los casos, por lo tanto rechazamos la Hipótesis nula ya que verificamos que los datos si tienen normalidad, a excepción de la variable “Índice de Riqueza (Región 16S)” que con un valor de 0,00013 es menor a 0,05 y concluimos que en éste caso los datos no se distribuyen normalmente.

Anexo 9. Correlaciones entre las variables físicas de los suelos frente a los índices de diversidad.

		pH	Conductividad eléctrica	Densidad Real	Densidad Aparente	% de porosidad	% de Materia Orgánica	% de arena	% de limo	% de arcilla	% Contenido de humedad
Índice de Shannon (región 16S)	Correlación de Pearson	,717*	-0,125	-0,071	-0,154	0,000	0,444	0,190	-0,010	-0,156	-0,369
	Sig. (bilateral)	0,020	0,731	0,845	0,671	1,000	0,199	0,598	0,979	0,666	0,294
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Índice de Riqueza (región 16S)	Correlación de Spearman	,667*	0,023	-0,015	-0,038	-0,004	0,444	0,252	-0,106	-0,124	-0,337
	Sig. (bilateral)	0,035	0,951	0,967	0,916	0,992	0,198	0,483	0,771	0,732	0,341
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Índice de Equitatividad (región 16S)	Correlación de Pearson	0,300	-0,399	-0,268	-0,411	-0,152	0,188	-0,087	0,043	0,116	0,140
	Sig. (bilateral)	0,400	0,253	0,454	0,238	0,674	0,604	0,812	0,905	0,751	0,700
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Índice de Shannon (región ITS)	Correlación de Pearson	0,093	,698*	0,115	0,119	0,250	0,575	-0,213	0,208	0,030	-0,340
	Sig. (bilateral)	0,798	0,025	0,751	0,744	0,486	0,082	0,554	0,564	0,935	0,336
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Índice de Riqueza (región ITS)	Correlación de Pearson	0,074	,638*	0,020	0,271	0,331	0,568	-0,230	0,395	-0,089	-0,407
	Sig. (bilateral)	0,839	0,047	0,957	0,449	0,350	0,087	0,522	0,258	0,807	0,243
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Índice de Equitatividad (región ITS)	Correlación de Pearson	0,098	0,444	0,295	-0,382	-,689*	0,113	0,019	-0,435	0,282	0,064
	Sig. (bilateral)	0,787	0,199	0,407	0,276	0,028	0,757	0,959	0,209	0,431	0,860
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

*. La correlación es significativa en el nivel 0,05 (bilateral).

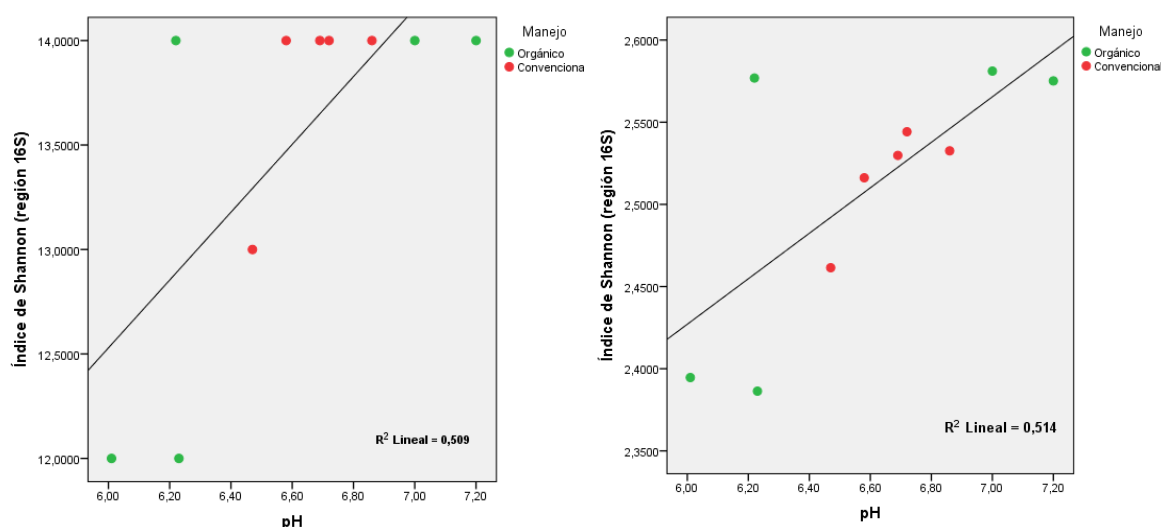
Celdas grises presentan resultados de correlación de Rho de Spearman.

En base al valor de significancia (0,05) comparándolo con el valor dado en la significancia bilateral ($< 0,05$) de la correlación se concluye que existe una correlación significativa para la Región 16 S entre las variables “Índice de Riqueza” y “pH” y entre el “Índice de Shannon - Weaver” y “pH”, mientras que para la región ITS se observan correlaciones significativas entre las variables

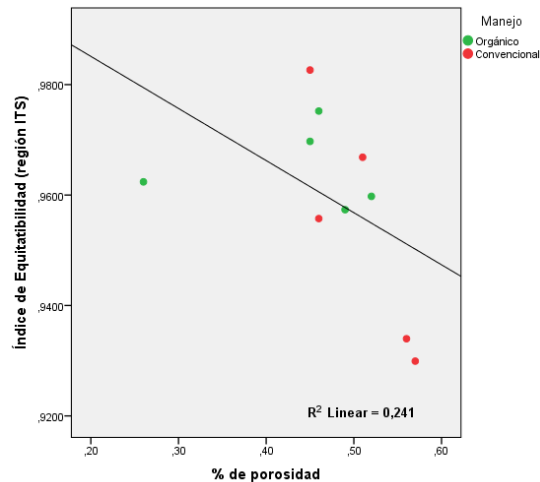
“Conductividad Eléctrica” e “Índice de Shannon – Weaver (Región ITS)”; entre las variables “Conductividad Eléctrica” e “Índice de Riqueza (Región ITSS)” y finalmente una correlación negativa entre las variables “Índice de equitatividad” y “% de porosidad”. No se observan más correlaciones significativas entre las demás variables.

A continuación se presentan los diagramas de dispersión para observar la tendencia general de los datos entre las variables correlacionadas mencionadas.

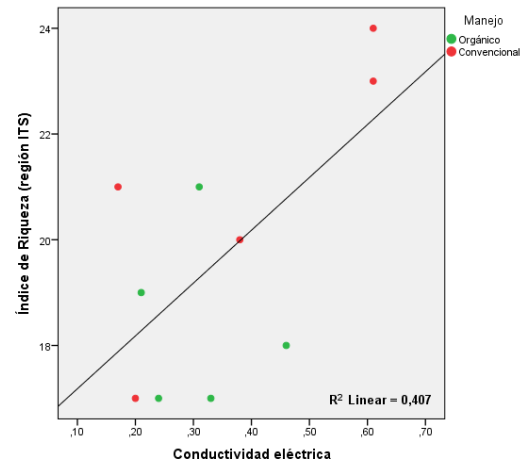
Anexo 10. Diagramas de dispersión entre las correlaciones.



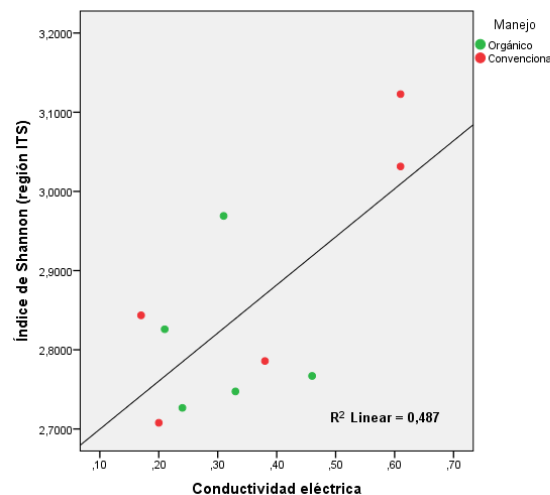
1. Diagrama de dispersión - correlación entre Índice de Riqueza (16s) y pH.
2. Diagrama de dispersión - correlación entre Índice de Shannon – Weaver (16S) y pH.



3. Diagrama de dispersión - correlación entre Índice de Equitatividad (ITS) y Porcentaje de porosidad.



4. Diagrama de dispersión - correlación entre Índice de Riqueza (ITS) y Conductividad eléctrica.

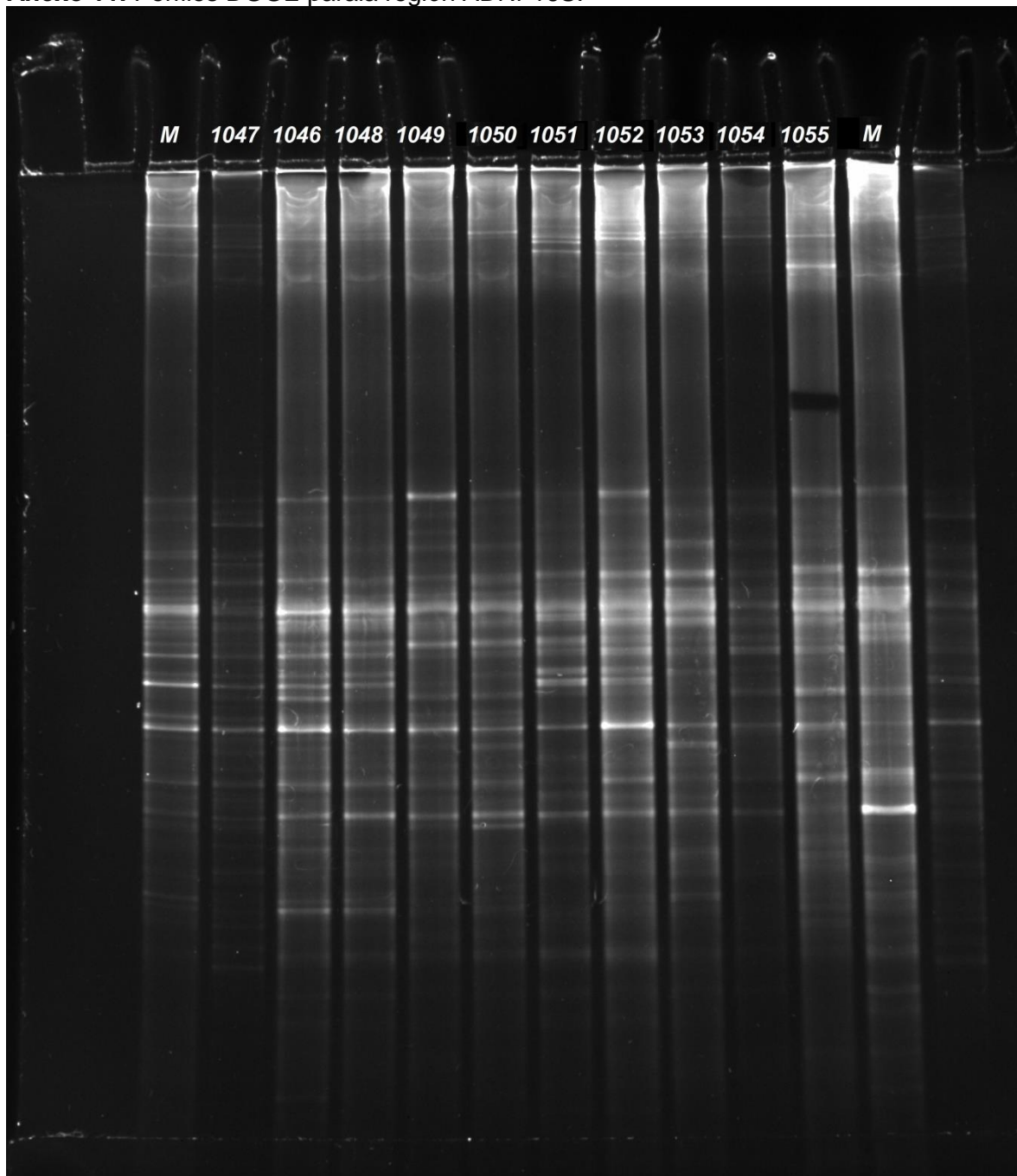


5. Diagrama de dispersión - correlación entre Índice de Shannon-Weaver (ITS) y Conductividad eléctrica.

1. Se observa una correlación positiva no lineal, lo que indica que la variable dependiente Y se ve influenciada por la variable X, pero esto no representa la tendencia de una influencia directa proporcional del pH del suelo al índice de riqueza, debido a que el valor de R^2 es igual a 0,509 lo que brinda la explicación del 51% de toda la variación.

2. El diagrama de dispersión muestra una correlación positiva lineal, es decir que las dos series de datos no son independientes, sin embargo dicha relación no nos permite asegurar estimar valores de X a través de los valores en Y, pues la ecuación de la recta muestra un valor de 0,514, lo que nos explica el 51% del total de la variación.
3. La correlación para éste último caso es negativa baja, es decir que la variable “% de porosidad” influye de manera baja a la variable “índice de Equitatividad (región ITS)”, el valor de R^2 nos indica que se explica únicamente el 24% de toda la variación.
4. Para éste caso el valor de R^2 indica una correlación positiva lineal (40% de toda la variación), es decir que existe dependencia entre las dos variables, pero los valores del Índice de riqueza no se pueden determinar en base a los valores de la Conductividad eléctrica.
5. Para éste caso la correlación positiva es baja con un valor de R^2 que explica el 48% de toda la variación, no nos permite establecer valores de la variable “índice de Shannon - Weaver” usando los valores de “Conductividad eléctrica”, sin embargo el gráfico muestra que no existe independencia entre ambas variables.

Anexo 11. Perfiles DGGE para la región ADNr 16S.



Anexo 12. Perfiles DGGE para la región ITS.

